Université de Strasbourg **Faculté de Pharmacie**

Année scolaire 1939-1940 No 238

ESSAI D'UTILISATION DU SEL DE REINECKE POUR LA RECHERCHE ET LE DOSAGE DES BASES ORGANIQUES EN TOXICOLOGIE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Janvier 1940
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention : Pharmacie)

par

M^lle MARGUERITE FALLER,
Pharmacien de l'Université de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse :

MM. Y. VOLMAR, Professeur, Président (mobilisé)
CH. LAPP, Professeur, président suppléant
P. DUQUENOIS, Maitre de conférences
Mme S. LALLEMAND, chef de travaux
} Juges

IMPRIMERIE «ALSATIA» COLMAR — 1939

Essai d'utilisation du Sel de Reinecke pour la recherche et le dosage des Bases organiques en Toxicologie

Université de Strasbourg **Faculté de Pharmacie**

Année scolaire 1939-1940 No 238

ESSAI D'UTILISATION DU SEL DE REINECKE POUR LA RECHERCHE ET LE DOSAGE DES BASES ORGANIQUES EN TOXICOLOGIE

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Janvier 1940
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le grade de Docteur de l'Université
(Mention : Pharmacie)

par

M^lle MARGUERITE FALLER,
Pharmacien de l'Université de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse :

MM. Y. VOLMAR, Professeur, Président (mobilisé)
CH. LAPP Professeur, président suppléant
P. DUQUENOIS, Maitre de conférences } Juges
Mme S. LALLEMAND, chef de travaux }

IMPRIMERIE «ALSATIA» COLMAR — 1939

A MA MÈRE

A MES SŒURS

EN TÉMOIGNAGE D'AFFECTION ET DE GRATITUDE.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

A MES JUGES

TÉMOIGNAGE DE VIVE GRATITUDE.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548006_0035

Avant - Propos

L'expert toxicologue peut être amené à rechercher deux sortes de bases organiques:

a) *les bases volatiles, telles que les amines aliphatiques ou aromatiques, les phénylhydrazines.*

b) *les bases fixes, telles que les phyrazolones, les bases puriques, les alcaloïdes, les ptomaïnes et leucomaïnes.*

Ces bases sont azotées et peuvent être caractérisées par toute une série de réactifs de précipitation connus. Voici quelques-uns parmi les plus employées:

le Réactif de Bouchardat *ou Réactif iodo-ioduré;*

— *de* Valser *à l'iodomercurate de potassium;*

— *de* Marmé *à l'iodure de cadmium et de potassium;*

— *de* Dragendorff *à l'iodobismuthate de potassium;*

— *de* Sonnenschein *à l'acide phosphomolybdique;*

— *de* Scheibler *au phosphotungstate de Na en solution à* 10 %;

— *de* Gabriel Bertrand *à l'acide silicotungstique en solution à* 5 %;

l'Acide picrique en solution saturée,

l'Acide pricrolonique,

le Ferrocyanure de potassium en solution concentrée,

la solution récente de tanin filtrée à 5%.

Tous ces réactifs réagissent différemment vis-à-vis des diverses bases organiques, présentant pour les uns des avantages, pour les autres des inconvénients, de sorte que nous avons été amenée, sur les conseils de Monsieur Duquénois, *à approfondir l'étude d'un autre réactif de précipitation déjà partiellement étudié, et connu*

sous le nom de Réactif de Reinecke [1], *dans le but d'apporter plus de précision dans son emploi.*

De nombreux biochimistes ont fait des expériences fort intéressantes avec le réactif de Reinecke, *pour ne citer que les plus importants, celles de* Christensen [2] *en* 1892, *et plus récemment celles de* Rosenthaler, [3] *en* 1927, Kapfhammer *et* Bischoff [4] *en* 1930, *de* Kahane [5] *en* 1931.

Reprenant à la suite de ces auteurs l'étude du réactif de Reinecke, *nous avons divisé notre travail en trois parties :*

Dans la première partie nous étudierons la précipitation des substances organiques à fonctions diverses, et les conditions de formation des reineckates.

La deuxième partie sera consacrée au dosage des bases organiques azotées, par gravimétrie ou par colorimétrie.

Dans la troisième partie nous appliquerons le réactif à la recherche microcristalline des bases organiques azotées.

Nous terminerons cette étude en comparant les résultats de nos recherches qualitatives et quantitatives avec ceux obtenus par les méthodes pré-existantes.

Avant d'entrer dans le détail de notre travail, nous exprimons toute notre reconnaissance à Monsieur Duquénois, *Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Professeur à l'Université d'Istamboul, qui nous a inspiré cette thèse et prodigué ses directives sûres et éclairées.*

Nous exprimons également toute notre gratitude à Monsieur le Professeur Volmar, *membre correspondant de l'Académie de Médecine, qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse, et nous l'en remercions vivement, ainsi que Monsieur* Ch. Lapp, *Professeur de Chimie Analytique, qui a bien voulu accepter d'être notre juge.*

Nos remerciements vont également aux Etablissements Roques, *de* Paris, *qui ont aimablement mis à notre disposition, sur la demande de Monsieur* Duquénois, *de petites quantités d'alcaloïdes provenant de leur fabrication, ainsi que la* Société du Traitement des Quinquinas *et la* S. E. M. P. A.

Les circonstances ont retardé l'impression de ce travail et en

ont modifié l'exposé. Ainsi, nous ne publierons qu'après les hostilités certaines utilisations intéressantes du Sel de Reinecke. *Ce sont également les événements qui nous obligent à soutenir cette thèse loin de la terre alsacienne et de la Faculté, auxquelles nous sommes attachée par tant de souvenirs. Qu'il nous soit permis d'associer à nos Maîtres de Strasbourg ceux qui, à l'Université de Clermont-Ferrand, auront pour mission effective d'examiner ce travail. Nous les assurons de notre sincère reconnaissance.*

PREMIÈRE PARTIE

Précipitation des substances organiques à fonctions diverses

CHAPITRE I

ACTION PRÉCIPITANTE DU SEL DE REINECKE

Nous avons étudié systématiquement l'action du Sel de REINECKE sur un grand nombre de substances organiques en solution acqueuse. Cette action précipitante des bases organiques est connue depuis les remarquables travaux de CHRISTENSEN [2]. Le Sel de REINECKE, sel d'ammonium à une molécule d'eau de l'acide chromidiammoniotétrasulfocyanique :

$$[Cr\ (NH_3)\ 2]\ (SCN)_4\ NH_4,\ OH_2$$

précipite les bases organiques et les alcaloïdes. Non seulement CHRISTENSEN [2] décrivit le premier et analysa ces précipités, mais il étudia les circonstances de la précipitation en fonction de la constitution de la base : les amines tertiaires donnent des reineckates moins solubles que les amines secondaires, moins solubles eux-mêmes que les reineckates d'amines primaires.

La règle de CHRISTENSEN fût étendue aux ammoniums quaternaires dont les reineckates sont encore plus insolubles, ce qui a permis l'application, en chimie biologique, au dosage d'une série d'ammonium quaternaires à côté des amines. Citons le dosage de la choline et de l'acétylcholine dans les tissus, celui de la musca-

rine, les ammoniums quaternaires pouvant être dosés à côtés des acides aminés et des autres constituants biologiques.

Christensen entrevit aussi les possibilités analytiques de ce réactif vis-à-vis des alcaloïdes, analysant les reineckates de morphine, de quinine, de strychnine et de cocaïne.

Plus récemment d'autres chimistes ont continués l'étude des reineckates, obtenant tantôt des sels anhydres, plus rarement des sels hydrates. Ernest Kahane [5] les cite dans sa « Revue de Chimie Analytique ». Parmi les reineckates anhydres, Nordenskyoeld [6] étudia la pipéridine, Hantzsch et Carlsohn [7] le tétraméthylammonium, le tétraéthylammonium et le méthylpyridinium, Hein et Segitz [8] le tétrapropylammonium Terada [9] la créatine, Kapfhammer et Eck [10], la pyroline et l'oxypyroline, Mamoli, Ciocca et Dansi [11], la mono- et diméthyl-aniline, Kapfhammer et Bischoff (4), la choline et l'actylcholine, Dakin [12] l'acide β amino — n — valérique.

Parmi les reineckates hydratés, Mamoli, Ciocca et Dansi [11] ont obtenu celui du tétraméthylammonium monohydraté, Kapfhammer et Spoerer [13], celui del'histidine, Smorodintzew [14] celui de la carnosine qui sont tétrahydratés.

Préparation du réactif de Reinecke.

Avant de continuer l'étude de réactif de Reinecke, rappelons brièvement sa préparation et ses propriétés, résumées d'ailleurs dans l'étude de Kahane [5]. Le procédé le plus avantageux consiste à faire fondre dans une capsule à une température de 120 à 130°, 200 gr. de sulfocyanure d'ammonium sec, auquel on ajoute lentement et par petites portions 40 gr. de bichromate d'ammonium finement pulverisé. La réaction se produit au fur et à mesure des additions de bichromate et s'accompagne d'un échauffement qui ne doit pas dépasser 160°. L'opération terminé on laisse refroidir: il se forme une masse rouge compacte, qu'on triture au mortier avec son poids d'eau et qu'on lave longuement à l'eau froide pour éliminer l'excès des deux sels qui ont servi à la réaction.

Les reineckates bruts d'ammonium et de guanidine ainsi obtenus sont épuisés par de l'eau à 50° ou 60 jusqu'à ce que le filtrat

ne dépose plus les lamelles rouges caractéristiques du sel de Reinecke. A ce moment on verse dans la liqueur une solution saturée de chlorure d'ammonium dans le but de précipiter la plus grande partie du sel de Reinecke encore dissout. Pour débarrasser le réactif ainsi obtenu de toutes ses impuretés, on le dissout dans de l'eau chaude et on le recristallise. On élimine en particulier ainsi le reineckate de guanidine, ou Sel de Morland, dont la solubilité est sensiblement la même à froid qu'à chaud.

Propriétés du Sel de Reinecke.

Le Sel de Reinecke se présente sous forme de petits cristaux brillants, d'un rouge violacé intense, devenant plus clairs et rosés par le broyage. Nous avons en effet constaté des différences selon la finesse de cristallisation : le produit préparé par les Usines Rhône-Poulenc était bien plus foncé que celui des Usines Merck à Darmstadt. De même Kahane indique que la solubilité à froid est de 4 gr. p. 100 environ. Avec le sel R.P. on obtient difficilement à froid une concentration supérieure à 2 % : pour obtenir une solution à 4 % il est nécessaire de faire la dissolution à chaud. laisser refroidir et filtrer après quelques heures de refroidissement. Le réactif Merck est plus soluble : 3 % environ à froid, mais nous avons constaté que les résultats obtenus avec le Sel de Reinecke de ces deux origine était les mêmes, en ce qui concerne l'action précipitante, que celui que nous avons préparé nous-même.

Le Sel de Reinecke doit être conservé dans des flacons bruns, bien bouchés, à l'obscurité et au frais, la lumière exerçant une action décomposante sur le complexe. La solution aqueuse nécessite les mêmes conditions de conservation. Après quelques semaines, elle est toujours altérée, ce qui est facile à constater, d'abord à la couleur qui, de rose vineux, deviens bruns violacé, ensuite par l'apparition de la réaction des sulfocyanures, avec les sels ferriques.

Nous avons cependant constaté qu'avec un réactif encore inaltéré, mais âgé de plus d'une semaine, les bases difficilement précipitables, ne précipitaient plus, tandi qu'elles l'étaient avec une solution fraîchement préparée.

Essais de Précipitation des Substances organiques à fonctions diverses.

Avec un réactif d'alcaloïde fut-il général, l'étude des circonstances de précipitation est nécessaire pour chacune des bases organiques. Tandis par exemple, que les silicotungstates répondent habituellement à la formule assignée par G. BERTRAND :

$$SiO^2, {}_{12}\ TuO^3.\ {}_4\ Alcal.\ n\ OH^2$$

certains d'entre eux échappent à cette règle comme l'ont indiqué JAVILLIER, ECALLE et BERTRAND lui-même. La formation quantitative des silicotungstates a été l'objet de variantes infinies, chaque auteur recommandant d'effectuer précipitation et lavages dans des milieux d'acidité spéciale à chaque cas particulier.

Il doit en être de même des reineckates. Leur insolubilité n'est pas absolue, et c'est ce qui nous a incités, au moment où le Sel de REINECKE devient un produit commercial courant, recommandé sans distinction pour la précipitation des bases aminées et des alcaloïdes, à préciser les conditions de son emploi.

L'action précipitante du Sel de REINECKE en solution aqeuse a été si bien étudiée par CHRISTENSEN (2), et précisée par tant de biochimistes, qu'il était à peine nécessaire de délimiter les familles qui donnent cette réaction.

Nous classons les substances organiques en trois groupes, suivant qu'ils précipitent immédiatement, qu'ils précipitent incomplètement après un certain temps, ou qu'ils ne précipitent pas le Sel de REINECKE.

a) — Les amines sont précipitées : les sels d'ammonium quaternaires possèdent les reineckates les plus insolubles (bromure de neurine, chlorure de choline, chlorhydrate de cotarnine, qui fonctionne comme ammonium quaternaire). Les amines tertiaires sont précipitées instantanément (triméthylamine, triéthylamine). Les amines secondaires le sont pour la plupart dans la série aliphatique (diméthylamine, diéthylamine). Les amines phénoliques donnent des précipités (sulfate d'aniline, sels d'o — et de p — toluidine) ; mais la diméthylaniline et la méthylaniline ont une action plus marquée que l'aniline elle-même.

Les bases hétérocycliques azotées, à l'état de sels précipitent énergiquement (pyridine, picoline, quinoléine, isoquinoléine). Il

est quelquefois nécessaire d'aciduler légèrement. Ainsi les pyrazolones (antipyrine, pyramidon) en solution aqueuse neutre ne produisent pas de précipités, la précipitation est immédiate et très abondante si l'on ajoute une goutte d'acide dilué. La créatinine ne précipite pas en milieu neutre, mais précipite abondamment en présence d'une goutte d'acide chlorhydrique dilué. Il en est de même de l'hexaméthylénetétramine, de la proline, qui est un acide α pyrrolidinecarbonique, de l'histidine qui possède un noyau glyoxaline. L'histamine dichlorhydrate est au contraire précipitée immédiatement. L'histamine est la β imidazoléthylamine. C'est une histidine décarboxylée, et elle a des propriétés bibasiques, alors que l'histidine est monobasique. Cette différence de basicité est probablement cause de la différence de p H de précipitation.

$N—C—CH^2 . CH^2 . NH^2$

$HC \quad \| \quad$

$NH . CH$ Histamine

$N—C—CH^2 . CH^2 . CH(NH^2) COOH$

$HC \quad \| \quad$

$NH . CH$ Histidine

Les amino alcools dont la fonction amine est secondaire ou tertiaire donnent une réaction positive immédiate en milieu neutre ou légèrement acide (triéthylaminoéthanol, diéthylaminoéthanol, stovaïne, novocaïne).

Nous avons essayé l'action du sel de Reinecke sur quarante alcaloïdes répondant à des constitutions diverses : tous ont été immédiatement et abondamment précipités. Certains cependant possèdent des reineckates un peu solubles dans l'eau et leur précipitation ne peut être quantitative.

Les protéides (ovalbumine, ovoglobuline..) se troublent immédiatement; le précipité s'accumule par action de la chaleur.

b) — La peptone ne produit pas de trouble immédiat avec le réactif. La guanidine donne, après une à deux heures, un précipité peu soluble, identique au Sel de Morland, qui prend naissance dans la préparation du Sel de Reinecke. La méthylguanidine

forme un précipité incomplet, sans doute à cause de la solubilité appréciable de son reineckate dans l'eau froide. Le phénylhydrazine ne nous a pas donné de précipité immédiat, ni en milieu neutre, ni en milieu acide. Après plusieurs heures la liqueur se trouble. Nous ne pouvons expliquer cette lenteur du reineckate de phénylhydrazine à se séparer, car d'après CHRISTENSEN (2) il serait très peu soluble dans l'eau froide. Nous n'avons réussi à l'isoler qu'en employant des solutions très concentrées.

Les amines primaires aliphatiques sont lentes à précipiter (éthylamine, propylamine, allylamine). Cependant les essais effectués avec la cadavérine, diamine primaire aliphatique, montrent que malgré sa lenteur la précipitation est complète après 24 heures.

c) — Parmi les substances ne donnant pas de reineckates insolubles citons les carbures, les dérivés halogènes, les dérivés nitrés, les alcools, les aldéhydes, les cétones, les acides, les esters, les phénols et leurs dérivés immédiats. Ainsi la méconine, l'acide méconique ne précipitent pas. Nous avons essayé la réaction en milieux alcoolique quand les substances n'étaient pas soluble dans l'eau.

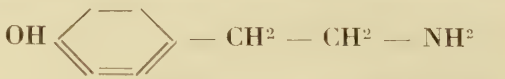
Les sels d'hydroxylamine ne donnent qu'un léger trouble après plusieurs heures. Les aldoximes, les sels d'hydrazine, les amides (oxamide, urée, acétanilide). Le glutathion qui est une amide (glutaminylcystéinylglucine) ne précipite pas, même en milieu acide. La colchicine, qui est une amide grasse est dans le même cas tout au moins en milieu neutre. En milieu acide, il se forme un précipité jaune, mais le reineckate est décomposé. La pipérine (amide pipéridique de la pipéridine) ne donne pas de précipité. Dans certaines conditions d'acidité la pipéridine au contraire permet d'obtenir un reineckate insoluble. L'uréthane, les uréides, les barbituriques (véronal, véronal sodique,..) la créatine, les bases puriques (caféine, théophylline, théobromine..), soit en solution aqueuse sous forme de sels doubles, soit en solution alcoolique, conduisent à des résultats négatifs. La caféine et la théobromine, non soluble à froid, ont été dissoutes à chaud, refroidies et précipitées par le Sel de REINECKE sans donner de précipité. Nous avons ensuite essayé de préparer le soluté injectable de caféine comme l'indique le Codex, en triturant au mortier

0,0 424 de caféine
0,0 60 de benzoate de sodium
5 à 10 cc d'eau distillée.

Le benzoate de soude a été successivement remplacé par le salicylate de sodium et le citrate de sodium.

Seul le citrate de caféine ainsi obtenu, a donné avec les réactif de REINECKE et seulement après deux heures, quelques rares cristaux en étoile, très gros et visibles à l'œil nu, dont la composition était voisine de l'acide citrique et n'étaient pas un reineckate. En effet, les cristaux recueillis sur un filtre ont été lavés à l'eau distillée et sèchés pendant plusieurs jours à l'exsiccateur. Ensuite nous avons fait la réaction qualitative de l'acide citrique qui consiste à dissoudre un cristal dans un tube à essais avec un peu d'eau. On ajoute une solution alcoolique de vanilline, on évapore à sec dans une capsule au bain-marie. Le résidu, humecté de quelques gouttes de $H^2\ SO^4$ à 25 %, est remis au bain-marie pendant 15 minutes. Nous avons obtenu la coloration violette caractéristique de l'acide citrique. Les cristaux obtenus avaient encore une réaction acide. D'ailleurs les bases puriques ne précipitent pas les réactifs généraux des alcaloïdes : seule la caféine précipite le réactif de DRAGENDORFF (formule d'Yvon).

Les substances organiques à fonctions complexes, possèdant à la fois une fonction amine et une autre fonction à caractère acide, voient disparaître leur faculté de donner des reineckates insolubles. Ainsi l'acide picramique dérive de l'aniline par substitution dans le noyau de deux groupes nitro et d'un oxhydryle phénolique. Alors que les sels d'aniline sont précipités immédiatement l'acide picramique ne donne plus de reineckate insoluble. L'adrénaline a une chaîne aminée secondaire, mais n'a pas de caractère basique par suite de sa fonction α — diphénol. Elle ne précipite ni par les réactifs généraux, ni par le Sel de REINECKE. Par contre nous avons étudié la tyramine, autre amino-phénol, dont la fonction amine est primaire, mais qui n'a qu'une fonction phénolique. La tyramine



à l'état de chlorhydrate neutre, en solution assez concentrée donne un beau précipité cristallin, assez peu soluble dans l'eau. L'hor-

dénine qui est son dérivé diméthylé à l'azote est très facilement précipité, de même que l'éphédrine en milieu concentré. Parmi les protides, un exemple intéressant est celui des acides α — amines. Ces amines, primaires pour la plupart (glycocolle, alanine, acide glutanique) ne précipitent pas, même après un long contact avec le réactif. Le tryptophane, ou acide α — amino — β — indolpropionique ne donne pas de précipité, même en milieu chlorhydrique. Le noyau indol n'entraine donc pas la précipitation des α — amino acides. Signalons que DAKIN [12] a remarqué une différence essentielle dans le comportement des acides β — aminés à fonction amine primaire (acide β — amino — n valérique). Ils donnent des reineckates peu solubles, ce qui semble indiquer que l'action du carboxyle sur l'aminogène est plus faible qu'en position α. Un acide α — aminé secondaire, la sarcosine, nous a donné un léger précipité après quelques heures.

Nous avons déjà indiqué plus haut que les amidines, qui possèdent le groupe C — NH, précipitent, au moins après quelques temps (guanidine, méthylguanidine). Nous avons essayé un acide aminé ou l'azote a le même mode de liaison (arginine) : on n'obtient pas d'opalescence immédiate, mais elle débute après dix minutes. Le précipité n'est abondant qu'après 24 heures, même en milieu acide.

Les arsenicaux organiques ne donnent pas de précipité en général (cacodylates, arrhénal, arsacétine, tréparsol, stovarsol). Cependant nous avons obtenu immédiatement un abondant précipité cristallin avec l'acétylarsan et l'arsaminol. Ce sont en effet des sels de la diéthylamine et du diéthylaminoéthanol. Nous avons ainsi un moyen rapide d'identifier ces deux arsénicaux parmi les autres que l'on emploie en thérapeutique et qui ne donnent pas de précipité. Les chloramines, les sulfamides et le rubiazol ne nous ont pas donné de précipité de reineckate dans les conditions habituelles et sans qu'il y ait au moins décomposition partielle.

En définitive, les sels d'ammonium quarternaires, les amines substituées, les bases hétérocycliques azotées, les alcaloïdes se prêtent particulièrement bien à la précipitation par le Sel de REINECKE.

Chapitre II

CONDITIONS DE PRÉCIPITATION DES REINECKATES

Pour précipiter les reineckates aussi quantitativement que possible, Kahane (5) recommande la technique suivante. On utilise une solution saturée à 4 % environ de Sel de Reinecke qu'on ajoute goutte à goutte et à froid dans une solutions concentrée et acidifiée des bases organiques. La concentration maximum est exigée, parceque certains reineckates sont solubles dans l'eau, le milieu acide parceque certaines bases ne précipitent pas en milieu neutre ou alcalin. On ajoute le réactif en excès jusqu'à ce que le liquide surnageant se colore en rose. Le précipité obtenu est rose clair, ou rose vineux suivant la base employée; certaines amines telle que la propylamine, la cadaverine, et l'allylamine donnent un précipité rose à reflet argenté. On laisse déposer le précipité à la glacière; une température plus élevée favoriserait la dissolution de certains reineckates assez solubles. Les auteurs recommandent en général de recueillir l'insoluble sur un filtre ou par centrifugation après 24 heures. Kahane (5) pense qu'on doit pouvoir faire la filtration après 30 minutes sans entraîner une erreur supérieure à 0,5 %. Les lavages du précipité doivent être fait à l'eau distillée glacée, suivis de lavages à l'alcool (qui dissout toutefois certains reineckates) ou à l'éther. La dessiccation ne peut se faire à une température élevée (100°), parceque la plupart des reineckates sont décomposés à cette température; on recommande en général de sècher le précipité à 65° ou 70°, ou mieux encore, dans le vide sulfurique à température ordinaire.

Les reineckates ainsi obtenus répondent habituellement à la formule suivante :

$$Cr\,(NH^3)^2\,(S\,CN)^4\ Alcaloïde$$

Le précipité sèché peut être pesé tel quel, ou à l'état de Cr^2O^3

après incinération. KAHANE ([5]) pense qu'il est particulièrement avantageux de doser 7 atomes d'azotes total pour 1 provenant de la base organique.

Nous avons fait les remarques suivantes au sujet des conditions optima de précipitation :

a) — Comme nous l'avons constaté plus haut, le Sel de REINECKE RHÔNE-POULENC permet difficilement d'atteindre à froid une concentration supérieure à 2 %. Ainsi nous avons trouvé que le sel de REINECKE R. P. avait une solubilité de 2,3 % à 13° C, et celui que nous avons préparé nous-même se dissolvait à cette température à raison de 2,5 gr. %. Pour obtenir une solution à 3 ou 4 gr. % il aurait été nécessaire de faire la dissolution saturée à chaud, de laisser refroidir et de filtrer après quelques heures.

b) — En général, pour une quantité de 0,04 de base organique, nous avons employé 5 cc d'eau distillée. La précipitation est plus complète à 0° qu'à 15° pour toutes les bases étudiées. Nous avons cherché l'influence des sels neutres et celle du pH sur la précipitation. En présence du chlorure de sodium au 1/10 et au 1/100 le résultat n'est guère amélioré. L'avantage d'une précipitation quelquefois plus grande est compensée par la prolongation des lavages à l'eau pour éliminer complètement le chlorure de sodium. Le résultat est meilleur en présence de NH^4 Cl à 1 %. Nous nous sommes d'abord assurée dans un essai témoin, si l'addition pur et simple du sel de REINECKE a des solutions de NH^4 Cl de différentes concentrations, ne produisait pas un léger précipité par décomposition du Sel de REINECKE. La solution est restée limpide. Nous avons ensuite fait des solutions de NH^4 Cl à 1 : 10 et 1 : 100 que nous avons ajoutées à des solutions de bases pour les précipiter ensuite avec le réactif de REINECKE. Voici quelques résultats :

0,04 de sulfate de Vératrine + solution de NH^4 Cl 1 % = 0,047 de précipité de reineckates

0,04 de sulfate de Vératrine + solution de NH^4 Cl 1/10 = 0,03 de précipité de reineckates

0,04 de sulfate de Vératrine sans addition de NH^4 Cl = 0,041 de précipité de reineckates

0,04 de chlorhyd. d'Héroïne + solution de NH^4 Cl 1 % = 0,063 de précipité de reineckates

0,04 de chlorhyd. d'Héroïne + solution de NH^4 Cl 1/10 = 0,047 de précipité de reineckates

0,04 de chlorhyd. d'Héroïne sans addition de NH^4 Cl = 0,05 de précipité de reineckates

0,04 de chlorhyd, de Cocaïne + solution de NH^4 Cl 1 % = 0,08 de précipité de reineckates

0,04 de chlorhyd, de Cocaïne + solution de NH^4 Cl 1/10 = 0,065 de précipité de reineckates

0,04 de chlorhyd. de Cocaïne sans addition de NH^4 Cl = 0,073 de précipité de reineckates

La lecture de ces résultats montre clairement que c'est en présence d'une solution de NH^4 Cl 1 % qu'on obtient le maximum de précipité de reineckate. Mais si on dépasse cette teneur, le précipité est moins abondant, vraisemblablement à cause de la décomposition du reineckate. Ceci est à rapprocher de la décomposition que CHRISTENSEN remarqua en présence d'ammoniaque.

Dans presque tous les cas la précipitation est plus complète en milieu légèrement acide qu'en milieu neutre. L'addition d'une goutte de ClH dilué, amène la précipitation immédiate et abondante d'un reineckate insoluble. Nous avons effectué avec divers alcaloïdes des essais de précipitation en milieu plus ou moins chlorhydrique. En voici deux exemples :

Quinine chlorydrate	+ H Cl 3N	= 0,09	de reineckate
— —	+ H Cl N	= 0,085	—
— —	+ H Cl N/10	= 0,118	—
— —	+ H Cl N/100	= 0,08	—
Spartéine sulfate	+ H Cl 3N	= 0,072	de reineckate
— —	+ H Cl N	= 0,065	—
— —	+ H Cl N/10	= 0,086	—
— —	+ H Cl N/100	= 0,08	—

C'est donc généralement pour un pH de 4 à 4,5 que la précipitation est maximum.

Pour recueillir le précipité il est souvent inutile d'attendre plus de deux heures. Certaines amines disparaissent même partiellement si l'on attend plus d'une journée; d'autres par contre, comme la guanidine et la méthylguanidine ne précipitent qu'après une à deux heures. La spartéine donne un reineckate très ténu qu'il est

bon de laisser déposer une quinzaine d'heures avant de filtrer. Si cependant on désire éviter toute erreur si petite soit-elle, il faudrait faire pour chaque base précipitée avec le Sel de Reinecke, des prélèvements après des temps variés, pour déterminer le moment où le reineckate est le plus abondant.

c) — Si on effectue la précipitation dans un Erlenmeyer ou dans un ballon, il est difficile de détacher tout précipité des parois. Nous recommandons donc, d'effectuer cette opération dans de petits béchers de 100 cc, en les couvrant d'un verre à montre, si on laisse déposer le précipité plusieurs heures. Tant qu'on opère en milieux aqueux et non alcoolique ou étheré, on peut s'aider d'un agitateur pour détacher le précipité et l'entraîner sur le filtre. On munit l'agitateur d'un capuchon en caoutchouc (genre compte-goutte) pour faciliter l'enlèvement du précipité.

Si le volume de la solution à précipiter ne dépasse pas 10 cm^3, il est encore préférable d'effectuer la précipitation sur un verre-filtre, de manière à éviter tout transvasement.

d) — Les auteurs recommandent de laver les précipités à l'eau glacée, à l'alcool et à l'éther. Nous avons totalement abandonné l'alcoole à 95°, la majorité des reineckates d'alcaloïdes y étant solubles déjà à froid. L'éther ne dissout pas en général les reineckates quand il est employé par très petites portions, et il a l'avantage d'activer la dessiccation. Mais c'est surtout à l'eau glacée qu'on effectuera les lavages pour enlever l'excès de réactif. On peut généralement arrêter les lavages quand le filtrat n'est plus coloré, et qu'il ne précipite plus en milieu acide par le réactif silicotungstique, ce qui prouve q'on n'a pas entraîné de bases dans les eaux de lavage.

L'insolubilité des reineckates de bases organiques azotées dans l'eau froide n'est cependant pas générale. Nous avons fait des essais de solubilité sur des reineckates d'alcaloïdes en procédant de la façon suivante :

Nous avons dissout à refus des reineckates dans 30 cc d'eau distillée. Après quelques jours de contact à la température ordinaire nous avons prélévé exactement 20 cc que nous avons placés dans une capsule tarée et évaporés à 40°. La différence de poids multipliée par 5 donne la quantité pour cent de reineckate dissous.

Le *Tableau* suivant indique quelques-unes des solubilités ainsi déterminées :

Solubilité des Reineckates d'alcaloïdes dans l'eau à 18° C. :

Stovaïne	0,020 %
Cocaïne	0,025 %
Novocaïne	0,90 %
Narcotine	0,025 %
Quinine	0,025 %
Strychnine	0,03 %
Brucine	0,01 %
Morphine	0,05 %
Trigonelline	0,20 %
Ecgonine	0,075 %
Nicotine	0,06 %

Conclusion. — La solubilité des reneckates d'alcaloïdes dans l'eau est variable. Ainsi à 18° C celle du reineckate de trigonelline est huit fois plus élevée que celle des reineckates de cocaïne, de narcotine et de quinine. Néanmoins la solubilité dans l'eau glacée de 0° à 4° C est beaucoup plus faible et le dosage de la trigonelline est possible, sans erreur notable, si la précipitation et les lavages se font en milieu assez concentré et à basse température.

Les reineckates de certains acides-aminés sont également très solubles; le reineckate de glycocolle par exemple ne précipite pas, avons-nous dit, par mélange d'une solution de glycocolle et de réactif de Reinecke. Néanmoins ce reineckate a pu être isolé et sa solubilité dans l'eau a été mesurée. Elle est considérable et de l'ordre de 1 gramme pour 10 cm^3. L'histidine et l'histamine, dont nous avons rappelé plus haut la constitution, ont des reineckates également assez solubles dans l'eau. Le reineckate de proline est encore assez soluble. La tyramine, l'aniline, la méthylaniline, la guanidine fournissent des reineckates peu solubles dans l'eau. Nous avons cherché à préciser la solubilité des reineckates d'amines et à les comparer comme l'avait déjà fait Christensen [2] en tenant compte du degré de la fonction amine. Les résultats sont consignés dans le TABLEAU suivant :

Solubilité dans l'eau à 5° C. des Reineckates d'Alcoylamines :

Méthylamine	0,22 %
Diméthylamine	0,012 %
Triméthylamine ...	0
Tétraméthylammonium	0
Ethylamine	0,05 %
Diéthylamine	0,30 %
Triéthylamine	0,03 %
Tétraéthylammonium	0

De l'examen de ce TABLEAU, et de quelques autres solubilités déterminées en particulier sur les amines de la série propylique, il semble ressortir que la règle de CHRISTENSEN [2] n'est qu'une première approximation. Il n'y a pas une progression bien continue de la solubilité des reineckates depuis ceux d'ammonium quaternaires, jusqu'à ceux d'amines primaires. La solubilité peut en effet passer par un maximum pour les amines secondaires, comme c'est le cas de la diéthylamine et de la dipropylamine.

En définitive, les reineckates de trialcoylamines et d'ammonium quaternaires sont bien les plus insolubles dans l'eau, mais ceux de dialcoylamines ne sont pas toujours moins solubles que ceux d'alcoylamines primaires.

Voici quelques reineckates qui nous ont paru pratiquement insolubles dans l'eau froide :

Triméthylamine
Tétraméthylammonium
Tétraéthylammonium
Diméthylaniline.

Nous avons dit plus haut que le lavage à l'eau glacée ne pouvait être suivi sans danger de lavage à l'alcool à 95°, ce dernier exerçant déjà à froid une action dissolvante sur la majorité des reineckates.

Voici d'abord un TABLEAU de la solubilité des reineckates d'alcoylamines à froid, dans l'alcool à 95° , qui montre, dans la série propylique, un maximum de solubilité également pour l'amine secondaire :

Propylamine	3,0 gr. %
Dipropylamine	5,7 gr. %
Tripropylamine	3,0 gr. %
Tétrapropylammonium ..	1,0 gr. %

On constate que dans cette série la règle de CHRISTENSEN souffre une nouvelle exception. Par contre, dans la série méthylique et éthylique, il semble que les observations du savant danois se confirment, de même que dans d'autres séries. Il faut donc admettre que la règle de CHRISTENSEN, sans être absolue, constitue un guide précieux dans la précipitation et la séparation des amines par le Sel de REINECKE.

Nous n'avons pas déterminé pour tous les reineckates d'amines et d'alcaloïdes la solubilité dans l'alcool. Néanmoins, nous en avons chaque fois cherché l'ordre de grandeur, et voici comment elle se classe :

Solubles : guanidine, histidine, histamine, proline, tyramine, arginine, aniline, toluidine, morphine, éphédrine, brucine, novocaïne, narcotine, trigonelline, ecgonine, amines primaires en général et dipropylamine.

Peu solubles : amines secondaires (sauf la dipropylamine), pyridine, nicotine, diméthylpyridine, quinoléine, isoquinoléine, quinine, pilocarpine, strychnine, cocaïne. Le pyramidon possède un reineckate un peu soluble, mais avec lenteur.

Très peu solubles : amines tertiaires, sels d'ammoniums quaternaires, choline, cadavérine.

CHRISTENSEN (2) avait pu formuler une règle pour les amines; les alcaloïdes n'en supportent aucune qui relie la solubilité des reineckates à la constitution de la base.

D'autres alcools ont également le pouvoir de dissoudre les reineckates, en particulier le méthyol et le benzylol.

Ajoutons que les reineckates sont tous très solubles dans l'acétone à froid. C'est un caractère qui avait déjà été reconnu par bien des auteurs. Ici encore, nous avons cherché à préciser si la solubilité était en relation avec la constitution. En particulier nous avons comparé les amines primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires. Souvent ces déterminations sont assez difficile en raison de la volatilité du solvant. Comme d'autre part

la solubilité est souvent forte, atteignant jusqu'à 260 gr. $^0/_{00}$, nous avons dû travailler sur de petits volumes de solvant pour éviter un gaspillage de produit. Pour ces raisons, les chiffres que nous avançons ne peuvent constituer, avec cette méthode, qu'un ordre de grandeur.

Très solubles : Dipropylamine, Propylamine, Aniline, Ethylamine, Choline, Alcaloïdes en général.

Solubles : Prydine, Pipéridine, Trigonelline.

Peu solubles ou *très peu solubles :* Diméthylamine, Tétraméthylammonium.

Solubilité de quelques Reineckates d'Alcoylamines dans l'Acétone à 15° C. :

Méthylamine	0 gr. 62 %
Diméthylamine	0 gr. 05 %
Triméthylamine	0 gr. 32 %
Tétraméthylammonium	0 gr. 07 %
Ethylamine	0 gr. 15 %
Diéthylamine	4 gr. 00 %
Triéthylamine	7 gr. 1 %
Tétraéthylammonium	0 gr. 9 %

L'acétone n'est pas seule à dissoudre assez fortement les reineckates, et l'on peut dire que c'est un caractère général de toutes les cétones. Nous avons remarqué également que les esters dissolvent bien certains reineckates, et nous avons pu tenter ainsi une séparation de certains reineckates d'alcaloïdes. Enfin, nous nous sommes demandée si la solubilité des reineckates dans ces solvants n'était pas liée à la présence dans leur molécule du groupement R — Co — . S'il en était ainsi, les acides organiques et les chlorures d'acides, peut-être également les aldéhydes, devaient dissoudre les reineckates de bases organiques azotées. L'expérience nous a montré que les acides organiques, les dérivés des acides dissolvent mal les reineckates. Les esters et l'ester acétylacétique sont de bons dissolvants. Les aldéhydes ne se comportent pas tous de la même manière; les reineckates sont assez solubles dans l'éthanal, les aldéhydes benzoïque et cinnamique; ils sont très

peu solubles dans le propanal et l'isobutanal. Enfin, l'heptanal les dissout généralement bien. Pour ces aldéhydes, la vitesse de dissolution est, bien entendu, retardée par la viscosité.

D'une manière générale on peut donc dire que les reineckates sont très solubles dans les cétones, les esters, et assez solubles dans certains aldéhydes et alcools.

La grande solubilité dans les cétones s'explique par une lyophilie du complexe, due au groupe — SCN. Il est assez curieux de constater que les solvants des reineckates sont pour la plupart des solvants miscibles à l'eau. Mais ils comptent aussi un solvant de constitution assez différente et qui est très énergique, la pyridine.

e) — Nous avons déjà signalé que le lavage à l'éther, conseillé par nos devanciers, avait l'avantage de compléter la déshydratation. Donc, après le lavage à l'eau,, éliminer la majeure partie de celle-ci par aspiration sur le filtre, puis laver avec très peu d'éther, qui active la déshydratation. Toutefois ce lavage ne doit pas être prolongé dans le dosage de quelques bases, dont les reineckates sont légèrement solubles dans l'éther (histidine). Généralement l'éther froid dissout mal les reineckates :

Très peu solubles : arginine, novocaïne, narcotine, brucine, cocaïne.

Sensiblement insolubles : choline, trigonelline, créatinine.

f) — Après avoir montré la manière la plus judicieuse de laver les reineckates pour éviter toute perte, se pose la question, également délicate, de la dessiccation. Tous les auteurs sont d'accord pour ne pas dépasser une température de 70°, la plupart des reineckates étant thermolabiles. Ainsi quand on sèche le reineckate de novocaïne à 80°, il se produit une altération mise en évidence en redissolvant le produit dans l'acétone; un dépôt vert y reste insoluble. Les reineckates de certaines amines chlorées noircissent à des températures plus élevées. La dessication au vide sulfurique est longue et se prolonge souvent quelques heures, jusqu'à ce qu'on obtienne un poids constant. Nous conseillons donc de placer les reineckates dans une étuve réglée entre 40° et 45°, durant 8 heures environ, et ensuite à l'exsiccateur pendant 6 à 8 heures. Cette manière de faire permet d'écourter considérable-

ment le temps de dessiccation. Dans quelques cas particuliers cependant ce séjour préalable à l'étuve ne convient pas.

g) — Pour la filtration nous avons d'abord utilisé du papier filtre, dont nous avions fait la tare au préalable; mais nous avons rapidement constaté que ce papier diminuait de poids après la filtration, probablement en raison de l'acidité de la solution. Nous avons ensuite essayé de détacher les reineckates du papier après dessiccation, mais si on opère sur de très petites quantités, le précipité qui y reste adhérent entraîne une erreur qui n'est plus négligeable. La meilleure manière consiste à employer un verre poreux taré.

Deuxième Partie

Dosage des bases organiques azotées, par le Sel de Reinecke

S'il est reconnu au préalable que la base organique azotée que l'on cherche à doser (amine, alcaloïde, etc...) est complètement précipitée en solution aqueuse par le Sel de Reinecke, plusieurs méthodes analytiques peuvent être imaginées, s'appuyant sur cette propriété, pour déterminer quantitativement sa teneur dans une solution de titre inconnu.

La méthode la plus simple qui vienne à l'esprit consiste à isoler le précipité, le sécher et le peser. Elle est excellente, pour des quantités pondérables, et le facteur par lequel il faut multiplier le poids de précipité pour obtenir le poids de base est généralement avantageux. Il est d'environ 0,5 à 0,7 pour les divers alcaloïdes, plus petit encore pour les amines, dont certaines ont un poids d'environ 0,2.

Kahane et Coupechoux [15] ont également appliqué le dosage bromométrique des sulfocyanures à l'analyse des reineckates.

Une autre façon de procéder consiste à recueillir le reineckate, le calciner et peser le résidu vert de $O^3\ Cr^2$. Elle est rarement avantageuse, le poids d'oxyde obtenu étant souvent inférieur au poids d'alcaloïde cherché. Ainsi pour un sel d'alcaloïde de P. M. moyen comme le chlorydrate de narcéine, p = 7,04.

Cependant la méthode permet quelquefois de vérifier la formule d'un reineckate et dans ce cas nous avons généralement effectué la filtration et la calcination dans un creuset-filtre d'alundum.

Dans le même but, de déterminer la constitution, nous avons également dosé l'azote total du reineckate, méthode préconisée par KAHANE [5] et qui est plus précise que la précédente. En effet, on dose ainsi 7 atomes d'azote, dont un seul provenant de la base organique; on dispose alors d'une micro-méthode volumétrique, la méthode de PARNAS - WAGNER.

Nous avons essayé également de titrer le chrome dans le précipité en évaluant par différence le chrome resté dans le filtrat, en utilisant un excès connu de solution titrée de sel de REINECKE. Pour cela nous pouvions adapter la microtitrimétrie de FONTÈS, ou la technique colorimétrique de BEATTIE. C'est avant d'avoir eu connaissance de cette dernière que nous avons adopté une technique chromométrique dans les applications toxicologiques, en raison de sa rapidité et de sa commodité.

CHAPITRE I

DOSAGE GRAVIMÉTRIQUE

a) — Trente alcaloïdes et vingt bases aminées ont été dosées par pesée du reineckate dans les conditions optima décrites précédemment. Cette méthode d'une exécution longue et délicate, par suite de toutes les opérations que comporte la gravimétrie, telles que précipitation, filtration, lavages prolongés, dessiccation et pesée minutieuse, nous a donné, dans un grand nombre de cas, d'excellents résultats. Nous les avons comparés à ceux fournis par les autres méthodes pondérales, en particulier celle à l'acide silicotungstique de G. BERTRAND [16].

Cependant certains reineckates sont trop solubles dans l'eau pour qu'un dosage soit correct (éthylamine, propylamine, allylamine, méthylguanidine, méthylecgonine, ecgonine, hololcaïne, histidine, histamine...). D'autres sont moins solubles, mais trop encore pour permettre un meilleur dosage pondéral qu'avec l'acide silicotungstique (narcotine, benzoylecgonine). Il serait néces-

saire, comme l'ont indiqué P. Duquénois et M. Ellert dans un travail actuellement sous presse, si l'on voulait doser la narcotine par ce procédé, de tenir compte, par un coefficient correctif, de la solubilité non négligeable du reineckate dans l'eau. Il y aurait lieu également d'effectuer les lavages avec une solution saturée de reineckate. L'hordénine donne un poids supérieur, comme si le reineckate était hydraté. Un reineckate d'hordénine à 5 OH^2 vient du reste d'être signalé par Gonnard ([17]).

Enfin d'autres bases sont précipitées quantitativement (atropine, hyosciamine, homatropine, scopolamine, cocaïne, émétine, quinine, quinidine, cinchonine, cinchonidine, morphine, papavérine, strychnine, brucine, pilocarpine, spartéine, stovaïne, nicotine, cicutine, pyridine, trigonelline, choline, cadavérine, stypticine ou chlorhydrate de cotarnine (qui fonctionne comme base ammonium quaternaire). Signalons que la pyridine avait déjà été l'objet d'un dosage par pesée du reineckate en 1933 selon Chatelet ([18]).

Voici, consignés dans le tableau ci-dessous, les résultats numériques obtenus par les reineckates des différentes bases organiques azotées. Nous rappelons que l'anion du sel de Reinecke a pour P. M. 318, et c'est toujours cette même quantité qui réagit théoriquement sur 1 molécule d'alcaloïde monobasique.

Résultats gravimétriques des reineckates d'alcaloïdes et d'amines

Bases organiques azotées	Poids mol. du sel employé	Poids mol. du reinecka-théorique	Quantité de bases org. employées	Poids théorique du précipité	Poids effectif du précipité
Arécoline bromhydrate $C^8H^{13}NO^2 \cdot H\,Br$	236	473	0,04	0,0801	0,075
Atropine sulfate $(C^{17}H^{23}NO^3)^2\ SO^4H^2\ H^2O$	694	1214,4	0,04	0,0699	0,0695
Homatropine bromhydrate $C^{16}H^{21}NO^3\ H\ Br$	356	593,1	0,04	0,066	0,064
Scopolamine bromhydrate $C^{17}H^{21}NO^4H\ Br,\ 3\ H^2O$	438	621,2	0,04	0,0567	0,052
Cocaïne chlorhydrate $C^{17}H^{21}NO^4\ HCl$	339,5	621,2	0,04	0,0731	0,073
Benzoylecgonine hydraté $C^{16}H^{19}NO^4\ 4\ H^2O$	361	607	0,04	0,0672	0,057
Méthylecgonine chlorhydrate $C^{11}H^{17}NO^3HCl+H^2O$	253,5	518	0,04	0,081	0,03
Emétine chlorhydrate $C^{29}H^{40}N^2O^4\ 2\ HCl+12\%\ H^2O$.	628 env.	799,1	0,04	0,0508	0,05
Quinine sulfate basique $(C^{20}H^{24}N^2O^7)^2\ SO^4H^2+8\,H^2O$.	890	1284 ou 1920	0,04	0,0577 ou 0,086	0,115
Quinine chlorhydrate basique $C^{20}H^{24}N^2O^2HCl+2\,H^2O$	396,5	642,5 ou 960,2	0,04	0,0647 ou 0,1004	0,118
Quinidine sulfate basique $(C^{20}H^{24}N^2O^2)^2\ SO^4H^2+2\,H^2O$.	782,5	642,5	0,04	0,0656 ou 0,098	0,09
Cinchonine chlorhydrate $C^{19}H^{22}N^2O\ HCl+2\,H^2O$	366,5	612	0,04	0,0669	0,105

Bases organiques azotées	Poids mol. du sel employé	Poids mol. du reinecka-théorique	Quantité de bases org. employées	Poids théorique du précipité	Poids effectif du précipité
Morphine chlorhydrate $C^{17}H^{19}NO^3$ $HCl+3\,H^2O$	375,5	603	0,04	0,0642	0,064
Codéine phosphate $C^{18}H^{21}NO^3$, $PO^4H^3+2\,H^2O$	433	617,2	0,04	0,0570	0,057
Papavérine chlorhydrate $C^{20}H^{21}NO^4\,HCl$	375,5	657,1	0,04	0,0699	0,069
Héroïne chlorhydrate $C^{17}H^{17}$ $[(C^2H^3O)^2O^3N]$ $HCl+H^2O$	423,6	687,1	0,04	0,0648	0,05
Narcophine $(C^{17}H^{19}O^3N)$ $(C^{22}H^{23}O^7N)$ $C^7H^4O^7+4\,H^2O$	970,4	1334,3	0,04	0,055	0,05
Narcotine chlorhydrate $C^{22}H^{23}NO^7$, HCl	449,5	731	0,04	0,065	0,062
Narcéine chlorhydrate $C^{23}H^{27}NO^8 \cdot HCl$, $3\,H^2O$	535,5	763	0,04	0,0569	0,056
Strychnine sulfate $(C^{21}H^{22}N^2O^2)^2SO^4H^2+5H^2O$.	856,5	1304,4	0,04	0,0609	0,060
Strychnine azotate $C^{21}H^{22}N^2O^2 \cdot NO^3H$	397	652,2	0,04	0,0656	0,065
Brucine base $C^{23}H^{26}N^2O^4+4\,H^2O$	466,2	712,2	0,04	0,0611	0,061
Vératrine sulf.	627,6	909	0,04	0,0579	0,041
Physostigmine salicyl. $C^{15}H^{21}O^2N^3 \cdot C^7H^6O^3$	413,25	593,2	0,04	0,0574	0,052
Physostigmine sulfate $(C^{15}H^{21}O^2N^3)^2\,SO^4H^2$	648,4	1186,4	0,04	0,073	0,071
Trigonelline chlorhydrate $C^7H^7\,NO^2\,HCl$	173,5	455	0,04	0,104	0,104

Bases organiques azotées	Poids mol. du sel employé	Poids mol. du reinecka-théorique	Quantité de bases org. employées	Poids théorique du précipité	Poids effectif du précipité
Spartéine sulfate					
$C^{15}H^{26}N^2\ SO^4H^2+5\ H^2O$	422,3	552,3 ou 870,3	0,04	0,0523 ou 0,082	0,086
Pilocarpine azotate					
$C^{11}H^{16}N^2O^2\ NO^3H$	271	526,1	0,04	0,0776	0,077
Pilocarpine chlorhydrate					
$C^{11}H^{16}N^2O^2\ HCl$	244,5	526,1	0,04	0,086	0,085
Hordénine chlorhydrate					
$C^{10}H^{15}NO\ HCl$	201,6	483	0,04	0,095	0,110
Nicotine base					
$C^{10}H^{14}N^2$	162	798	0,04	0,197	0,193
Cicutine bromhydrate					
$C^8\ H^{17}N\ BrH$	208	445	0,04	0,0855	0,085
Holocaïne chlorhydrate					
$C^{18}H^{22}O^2N^2,\ HCl$	334,5	616,2	0,04	0,0736	0,063
Hyoscyamine sulfate					
$(C^{17}H^{23}NO^3)^2\ SO^4H^2+2\ H^2O$ ..	712	1214,4	0,04	0,0682	0,069
Stovaïne					
$C^{14}H^{21}NO^2 \cdot HCl$	271,6	553,1	0,04	0,0814	0,086
Novocaïne					
$C^{13}H^{20}N^2O^2 \cdot HCl$	272,6	555 ou 873	0,04	0,081 ou 0,127	0,126
Cotarnine chlorhydrate					
$C^{12}H^{14}O^3NCl,\ 2\ H^2O$	291,6	555	0,04	0,0761	0,076
Antipyrine					
$C^{11}H^{12}N^2O$	188	506	0,04	0,1076	0,06
Pyramidon					
$C^{13}H^{17}N^3O$	231	549	0,04	0,095	0,09

Bases organiques azotées	Poids mol. du sel employé	Poids mol. du reinecka-théorique	Quantité de bases org. employées	Poids théorique du précipité	Poids effectif du précipité
Pyridine C^5H^5N	79	397	0,066	0.331	0,330
Aniline sulfate $2(C^6H^5NH^2)$, SO^4H^2	307	411	0,04	0,0544	0,07
Guanidine chlorhydrate $HN-C(NH^2)^2$, HCl	95,5	377	0,04	0,157	0,095
Méthylguanidine chlorhydrate $CH^3NH\ C(NH)\ N\ H^2\ HCl$	109,5	391	0,04	0,142	0,05
Triméthylamine sol à 33 % $N(CH^3)^3$	59	377	0,0165	0,105	0,10
Neurine bromhydrate $(CH^3)^3N(CH=CH^2)\ Br$	165,9	403	0,04	0.0971	0.0936
Choline chlorhydrate $(CH^3)^3N(C^2H^4OH)\ Cl$	139,5	422	0,04	0,121	0,118
Ethylamine chlorhydrate $C^2H^5NH^2\ HCl$	81,5	363	0,033	0,146	0,04
Propylamine $CH^3CH^2CH^2-NH^2$	59	377	0,04	0,255	0,08
Cadavérine bichlorhydr. $H^2N(CH^2)^5\ NH^2\ 2\ HCl$	178	423 ou 741	0,04	0,095 ou 0,166	0,17
Allylamine $CH^2=CH\cdot CH^2\ NH^2$	57	375	0,05	0,329	0,21

La lecture de ces chiffres montre que dans de nombreux cas la méthode au sel de REINECKE convient pour doser les bases organiques aussi bien que celle de BERTRAND. Cette dernière est même assez délicate pour la morphine et fournit un résultat légèrement déficient. Le sel de REINECKE donne un résultat théorique dans ce cas particulier.

Certains alcaloïdes à fonction lactonique sont réputés incomplètement précipitables par le réactif de G. BERTRAND [16]. Ainsi JULIEN [19] a constaté qu'elle donne des résultats trop faibles avec la pilocarpine. Le sel de REINECKE permet un dosage très exact. Voici les poids de reineckate obtenus à partir de 0,04 gr. de sel de pilocarpine :

	Calculé	Trouvé
Nitrate de pilocarpine	0,0776	0,077
Chlorhydrate de pilocarpine	0,086	0,085

W. J. FURST [20], essayant de doser la trigonelline par pesée du silicotungstate, obtient une erreur par défaut assez sensible. Au contraire la trigonelline nous a donné le résultat théorique, à condition d'aciduler légèrement le milieu; avec une prise d'essai de 0,04 de chlorhydrate de trigonelline, la quantité de reineckate est :

Calculé : 0,104 Trouvé : 0,104.

Aussi le dosage de la trigonelline a-t-il été résolu dans le fenugrec par cette méthode.

Par contre, la même méthode ne peut être préconisée pour la narcotine, autre alcaloïde à fonction lactonique. L'erreur relative est de — 4 à — 6 %.

La brucine n'a pu être dosée sous forme de silicotungstate : JULIEN [19] mentionne ses essais infructueux à cet égard et cite ceux de KLJATSCKINA et de STRUGADSKI. La méthode qui consisterait à doser l'azote totale de l'alcaloïde serait bien peu précise. Nous avons obtenu un excellent chiffre à condition d'éviter le lavage à l'alcool et à l'éther.

Prise d'essai : 0,04 gr. brucine quadrihydratée.

Reineckate : calculé 0,0611, trouvé 0,061.

Donc l'emploi du complexe chromique est quelquefois sûr et précis, préférable à une autre méthode de précipitation.

b) — Il est nécessaire de rappeler que suivant la basicité de l'alcaloïde le reineckate peut renfermer une ou deux molécules de sel de Reinecke pour une molécule d'alcaloïde. La formule des reineckates d'amines ou d'alcaloïdes monobasiques est :

$$[Cr\ (NH^3)^2\ (SCN)4]\ \text{Alcaloïde.}$$

C'est le cas des monoamines, des alcaloïdes ne possédant qu'un atome d'azote (acécoline, atropine, cocaïne, morphine, narcotine, trigonelline...) et de quelques autres possédant plusieurs atomes d'azote dont un seul est basique vis-à-vis du sel de Reinecke (2 N : strychnine, brucine, pilocarpine) (3 N : ésérine). Mais les diamines (cadavérine) et certains alcaloïdes (quinine, quinidine, cinchonine, cinchonidine, spartéine), nous ont donné des résultats qui correspondent à la constitution :

$$[Cr\ (NH^3)^2,\ (SCN)4]\ 2\ \text{Alcaloïde.}$$

Voici, résumés dans un tableau, les résultats obtenus par dosage de l'oxyde de chrome de quelques alcaloïdes et amines à double basicité :

Dosage du Chrome.

2 molécules de sel de Reinecke + 1 molécule de base organique azotée $O_3\ Cr_2$ = 152 P. M.

Quinine chlorhydrate : P. M. de la base = 324,5
2 x P. M. du sel de Reinecke = 636

960,5

960,5 152
0,25 (quantité de reineckate employée) 0,25 x 152

$$\frac{0,25 \times 152}{960,5} = 0,0395$$

Quantité trouvée 0,039

Quinine sulfate P. M. de la base = 324,5
2 x P. M. du sel de Reinecke = 636

960,5

960,5 152

0,35 (quantité de reineckate employée) $\frac{0{,}35 \times 152}{960{,}5} = 0{,}0554$

Quantité trouvée 0,055

Quinidine sulfate : P. M. de la base = 324,5

2 x P. M. du sel de REINECKE = 636

960,5

960,5 152

0,50 (quantité de reineckate employée) $\frac{0{,}50 \times 152}{960{,}5} = 0{,}0791$

Quantité trouvée 0,075

Cinchonine chlorhydrate : P. M. de la base = 294

2 x P. M. du sel de REINECKE = 636

930

930 152

0,50 (quantité de reineckate employée) $\frac{0{,}50 \times 152}{930} = 0{,}081$

Quantité trouvée 0,080

Cadavérine chlorhydrate : P. M. de la base = 105

2 x P. M. du sel de REINECKE = 636

741

741 152

0,50 (quantité de reineckate employée) $\frac{0{,}50 \times 152}{741} = 0{,}1025$

Quantité trouvée 0,10

Conclusion : Le dosage du Chrome à l'état de O^3 Cr^2 dans les reineckates de quinine, de quinidine, de cinchonine, de cadavérine montre que la molécule de ces alcaloïdes est précipitée par deux molécules de sel de Reinecke. Nous avons par la suite continué à effectuer une série de dosages sous forme de O^3 Cr^2 après incinération, dans le but de les comparer à ceux obtenus par pesée des reineckates.

Ainsi la trigonelline, dont le poids théorique est de 0,083 pour une prise d'essai de 0,50 gr., nous a donné un résultat expérimental de 0,082.

Nous rapelons que nous avons employé, pour la filtration et la calcination, un creuset-filtre d'alundum.

c) — La plupart des reineckates sont anhydres, quelques-uns cependant sont hydratés et ne perdent pas leur eau de cristallisation dans le vide sulfurique, mais l'abandonnent à 100 - 105°. Ainsi ceux de cadavérine, de quinine cristallisent avec $2H^2O$, celui d'hordénine avec $5H^2O$, celui du tétraméthylammonium avec $1H^2O$ et celui de la carnosine avec $4H^2O$.

Il est intéressant d'étudier spécialement la basicité des divers alcaloïdes vis-à-vis du sel de Reinecke. Remarquons tout d'abord que les substances organiques qui forment des reineckates présentent une basicité marquée. Ainsi la créatinine, base forte, en donne un, tandis que la créatine, qui est neutre, n'en donne pas.

Que la strychnine, la brucine et la pilocarpine se combinent à une seule molécule de complexe, cela se conçoit. La strychnine et la brucine possèdent deux atomes d'azote, mais sont monobasiques : l'un de ces atomes fait parties d'une fonction lactamine et n'a pas de caractère basique. La pilocarpine est une base à deux atomes d'azote, qui se comporte comme monoamine tertiaire. Elle joue vis-à-vis des acides le rôle d'une base monovalente.

Il n'en est pas de même des alcaloïdes des quinquinas : quinine, quinidine, cinchonine, cinchonidine, dont les deux atomes d'azote sont basiques et pour lesquels quelques auteurs n'ont pas cru à un reineckate défini. La spartéine également a les propriétés d'une diamine bitertiaire. La nicotine joue aussi le même rôle à cause de ses deux azotes basiques.

Enfin indiquons que la créatinine, qui ne précipite pas avec

le réactif BERTRAND, peut être dosée à côté de la créatine grâce au sel de REINECKE.

Il est inutile d'insister sur l'intérêt que peut présenter une méthode pondérale nouvelle de dosage des bases organiques. Cette méthode ne se substitue pas aux méthodes existantes. Elle peut néanmoins se révéler supérieure à celles-ci dans plusieurs cas, et les analystes devront user d'éclectisme pour doser une base organique déterminée. Dans le cas où ils emploient le sel de REINECKE ils devront étudier les conditions optima de précipitation et de lavage, qui peuvent différer, comme nous l'avons fait remarquer, d'une substance à l'autre.

CHAPITRE II

DOSAGE COLORIMÉTRIQUE

Les méthodes générales de dosage des alcaloïdes peuvent s'appliquer à la détermination quantitative de ces poisons, après extraction des viscères. Les méthodes pondérales sont d'une précision qui les fait habituellement recommander; ainsi les méthodes de G. BERTRAND puis d'YVON et de JAVILLIER, qui utilisent la pesée du silicotungstate d'alcaloïde, ou mieux de l'anhydride silicotungstique après calcination, la méthode au sel de REINECKE, par pesée des reineckates d'alcaloïdes, sont d'un emploi commode si la dose extraite est suffisante.

Néanmoins, la quantité de poison organique fixe isolée est fréquemment de l'ordre de 1 à 5 milligrammes, soit que la dose léthale est très petite (aconitine par exemple), soit que la quantité de viscères dont on dispose ne représente qu'une faible partie des viscères totaux et du sang. Dans de telles expertises, il est souvent difficile au toxicologue, ne disposant pas d'une installation de microanalyse, de peser avec quelque rigueur des précipités de 1 à 5 milligrammes, si l'on considère que les masses sont

déterminées par différence, grâce à l'emploi d'un creuset ou d'un verre de montre.

Dans une étude publiée avec Monsieur DUQUÉNOIS ([21] et [22]) sur la « Précipitation des bases organiques par le sel de REINECKE en chimie analytique et en Toxicologie », nous avons indiqué comment peut-être résolue la difficulté. Nous avons utilisé pour cela une précieuse propriété du réactif de REINECKE, que ne possèdent pas d'autres réactifs généraux des alcaloïdes, acides silicotungstiques, iodomercurate par exemple. Le réactif étant coloré, il est possible de doser une base aminée ou alcoloïdique en comparant au colorimètre la teinte du filtrat et celle du réactif de titre connu. Par différence on en déduit la quantité d'alcaloïde. Il en résulte plusieurs avantages :

1° L'adhérence du précipité aux parois du vase à précipitation n'est pas gênante comme c'est le cas lorsqu'on se propose de recueillir le précipité de reineckate pour la pesée.

2° La durée du dosage est singulièrement écourtée: il suffit de filtrer une heure après la précipitation et de comparer au colorimètre. Au total une heure et demie, compte tenu de la préparation de la solution titrée.

Technique :

Le résidu alcaloïdique, préalablement purifié pour le débarrasser des impuretés pigmentaires qui pourraient altérer la coloration rose du sel de REINECKE, est mis en solution par addition d'un cm^3 exactement d'eau distillés préalablement acidulée à raison d'une goutte de H Cl au 1/1000 par cm^3.

On prépare, d'autre part, une solution titrée récente de sel de REINECKE pur, ne présentant pas la réaction des sulfocyanures. Pour cela on dissout 0,159 gr. dans 20 cm^3 exactement d'eau distillée froide. La solution se fait rapidement à cette concentration; elle reste légèrement opalescente, malgré la disparition de toute phase solide. On filtre avec papier sans cendre de petit diamètre et le filtrat est clair. On ajoute un cm^3 de cette solution titrée (contenant 7,95 milligrammes de sel de REINECKE) à la solution préparée à l'alcaloïde. Il se forme un précipité rosé immédiat. Après agitation, on laisse déposer 20 minutes et l'on observe la couleur de la solution surnageante, qui doit être encore

franchement rose. S'il n'y avait qu'un faible excès de solution de sel de REINECKE on en ajouterait un second cm³.

La précipitation n'est complète pour beaucoup d'alcaloïdes qu'après 10 à 20 heures de repos à la glacière. Mais les essais que nous avons effectués avec un grand nombre d'entre eux en filtrant après une heure, nous paraissent entachés d'une erreur si petite que l'on peut la négliger dans un dosage colorimétrique. La filtration pourrait être effectuée sur un très petit filtre pondéral, mais souvent une légère perte de complexe coloré, retenu par la cellulose, conduit à des résultats un peu trop élevés en alcaloïdes. Nous préférons, pour cette raison, utiliser un filtre en verre poreux de petit diamètre et muni d'une longue douille; les filtres en verre poreux pour le dosage des sucres par la méthode BERTRAND conviennent parfaitement. L'aspiration doit être légère.

On compare le filtrat clair à un type préparé en mélangeant :

Solution titrée à 0,795 % .... 1 cm³
Eau distillée ..... 1 cm³

Il est nécessaire d'éclairer le colorimètre par un faisceau de lumière parallèle pour obtenir une bonne précision.

Le type est observé sous 5 millimètres ou 3 millimètres.

Pour tracer les courbes d'étalonnage on a fait une solution étalon du sel de REINECKE, à 0 gr. 795 %, telle que 1 cm³ contient7,95 mgr. de ce sel. On a préparé une série de dilutions dans des tubes à essais en mélangeant :

1 cm³ de sol. type + 1 cm³ d'eau = dilution I
1 cm³ de sol. type + 2 cm³ d'eau = dilution II
.....
1 cm³ de sol. type + 15 cm³ d'eau = dilution XV

Dans les examens colorimétriques, la dilution I, c'est-à-dire renfermant 7,95 mgr. de sel dans 2 cm³, a été choisie et examinée d'abord sous 5 mm, puis sous 3 mm d'épaisseur.

Les dilutions II, III etc... XV étaient vues sous l'épaisseur X pour obtenir l'égalité de teinte. Voici les chiffres expérimentaux et en regard les chiffres calculés avec la formule de BEER-LAMBERT :

Type vu sous 5 mm :

Dilution examinée	Epaisseur X expérimentale	Epaisseur X calculée
I	5,0	5,0
II	7,3	7,5
III	9,6	10,0
IV	11,9	12,5
IX	23,0	25,0
XV	33,0	40,0

Si l'on trace la courbe déduite de la loi de BEER-LAMBERT et la courbe expérimentale, on voit que ces deux courbes sont sensiblement superposées dans la moitié supérieure, pour s'écarter ensuite notablement. Il en est de même si le type est vu sous 3 mm. La loi de BEER-LAMBERT s'applique pour des concentrations ne s'éloignant pas trop de celle du type. De 7,95 milligrammes à 3 milligrammes de sel de REINECKE il serait nécessaire de se reporter à une courbe de correction. On peut aussi, comme nous l'indiquons plus haut, ajouter un nouveau cm^3 de solution titrée au moment de la préparation et tenir compte du nouveau volume dans le calcul.

Application à la morphine :

Prise d'essai : 1 cm^3 de solution de chlorhydrate de morphine, contenant 3,756 milligrammes de sel, soit 2,851 milligrammes de base.

On ajoute 1 cm^3 de solution titrée, soit 7,95 milligrammes de sel de REINECKE. Le filtrat X, qui est encore bien rose, est recueilli directement dans la cuve d'un colorimètre de BAUDOIN et BÉNARD. L'autre cuve contient la solution type T.

T vu sous 3 millimètres ..... $x = 5{,}1$ d'où $c = 4{,}67$

T vu sous 5 millimètres ..... $x = 8{,}4$ d'où $c = 4{,}73$

Quantité de sel de Reinecke ayant servi à la précipitation 7,95 — C

$$7{,}95 - 4{,}67 = 3{,}28$$
$$7{,}95 - 4{,}73 = 3{,}22$$

Or un milligramme de sel de Reinecke précipite 1,18 milligrammes de chlorhydrate de morphine.

Chlorhydrate de morphine trouvé : 3,80 à 3,87 milligrammes. L'erreur relative ne dépasse pas 6 à 8 % avec les alcaloïdes qui précipitent quantativement par le sel de Reinecke.

Troisième Partie

Recherche microcristalline des bases organiques azotées

Chapitre I

MÉTHODE DE ROSENTHALER POUR LES RECHERCHES MICROCRISTALLINES

Tous les reineckates ont sensiblement la même couleur rose un peu vineuse. Ils se décomposent tous avant de fondre. Ce sont là de fâcheuses propriétés pour l'identification des bases précipitées. Leur solubilité dans l'acétone est générale. Leur solubilité dans l'eau ou l'alcool présente, nous l'avons vu, des différences qui ont permis à Christensen [2], en ce qui concerne les amines, d'établir une règle pour la diagnose.

Mais la forme cristalline et surtout l'agencement et le groupement des cristaux permet de différencier nettement certaines bases organiques.

C'est Rosenthaler [3] qui, en 1927, eut le premier l'idée de proposer le sel de Reinecke pour la recherche microcristalline des bases organiques azotées et de quelques amino-alcools. Il a étudié de cette façon les reineckates d'arécoline, d'atropine, de berbérine, de quinine, de conine, d'hydrastinine, de morphine, de narcéine, de pilocarpine, de pipérine, de strychnine, de stovavaïne, de tutocaïne, de novocaïne, d'alypine, de cocaïne et de tropacocaïne. Plusieurs d'entre eux étaient préparés pour la première fois.

Le but de Rosenthaler était de suppléer en partie aux réactions de coloration par des combinaisons microcristallines de bases organiques azotées. Déjà un certain nombre de réactifs généraux de précipitation avaient été employés dans ce but, mais comme un même réactif précipite souvent dans la même forme cristalline des alcaloïdes différents, Rosenthaler jugeait utile

d'augmenter leur nombre, afin de choisir pour chaque base organique azotée le réactif de précipitation le plus caractéristique. On trouve une grande quantité de réactifs de précipitation parmi les acides et les sels dont l'anion est un métal lourd en combinaison complexe: ROSENTHALER a été amené à conclure que cela pourrait également être le cas pour le sel de REINECKE, supposition qui s'est trouvée justifiée. Naturellement ici encore il faut savoir faire un choix: tous les reineckates n'ont pas une cristallisation caractéristique, certains sont amorphes, d'autres se ressemblent trop pour qu'on puisse les employer judicieusement. Néanmoins le nombre de reineckates donnant une cristallisation caractéristique est intéressant, ce qui nous a déjà permis d'envisager toute une série d'applications.

Pour ses recherches microcristallines ROSENTHALER [3] opérait de la façon suivante : il plaçait une petite quantité d'alcaloïde sur une lame et ajoutait une goutte de solution de sel de REINECKE. Cette méthode ne nous a pas semblé facilement applicable à toutes les bases organiques azotées. Certaines en effet se dissolvent très difficilement: or il arrivait que la goutte de réactif était évaporée avant que ne fût achevée la dissolution du sel à étudier ou la formation des cristaux, qui est, comme on le sait, toujours précédée d'une phase où le précipité est amorphe. D'autre part, nous avons signalé plus haut que certaines bases ne précipitaient qu'en milieu acide: ajouter encore une goutte d'acide sur la lamelle, donnait un trop grand volume de liquide. Pour ces raisons il est préférable de dissoudre et de précipiter les bases organiques azotées sur un verre de montre, et de porter après 1/4 d'heure, au moyen d'une pipette effilée, une très petite quantité de précipité sur la lame. Pour bien observer la cristallisation, il est important de n'employer qu'une trace de sel à précipiter, afin que le reineckate ne devienne trop abondant et qu'une trop grande épaisseur de cristaux n'empêche sa rapide caractérisation au microscope. Pour obtenir des cristaux plus grands, on peut dissoudre le reineckate dans l'alcool et le faire recristalliser.

Nous indiquons ci-dessous les caractères micographiques de quelques reineckates cristallisés, qui sont extraits de l'étude de ROSENTHALER [3] avec la description qu'il nous en donne :

Fällungen von Alkaloiden mit Reineckes Salz.

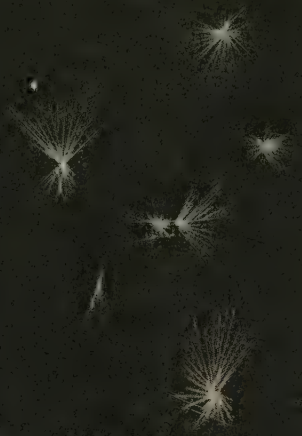


Abb. 1: Arekolin.

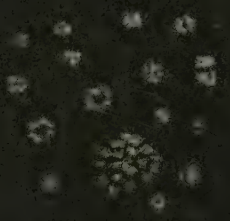


Abb. 2: Chinin.

Abb. 3: Coniin.

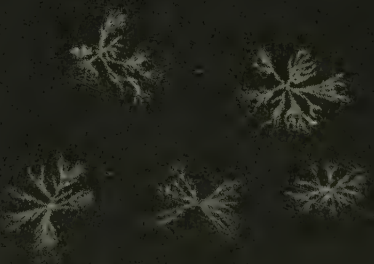


Abb. 4: Hydrastinin.

Abb. 6: Narcein.

Abb. 5: Morphin.

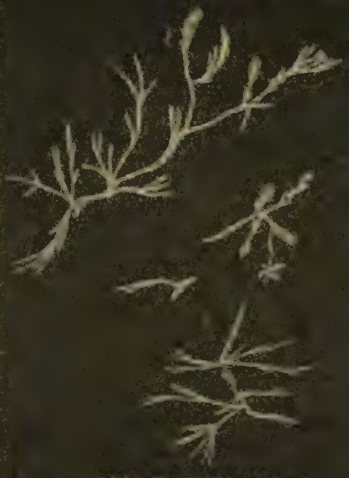


Abb. 7: Pilokarpin.

Abb. 8: Piperin.

Abb. 9: Strychnin.

Abb. 11: Tutokain.

Abb. 10: Stovain.

Abb. 12: Novokain.

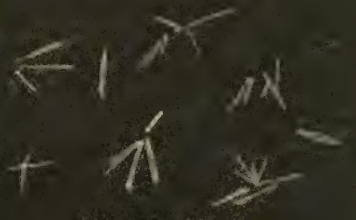


Abb. 13: Alypin.

Abb. 14: Kokain.

Arécoline bromhydrate :	Formation immédiate de touffes de petites aiguilles qui s'agrandissent peu à peu.
Atropine sulfate :	Assemblage rapide de cristaux en forme de feuilles avec bords plats sciés ou dentés.
Berbérine sulfate :	Formation lente de petites aiguilles s'assemblant aussi en étoiles ou touffes.
Quinine chlorhydrate :	Formation lente d'étoiles de petites et grandes aiguilles.
Conine bromhydrate :	La formation principale est constituée par des cristaux en rosettes avec des bords finement incisés. On remarque également très souvent de grandes aiguilles dues probablement à des impuretés.
Hydrastinine chlorhydrate :	Touffes d'aiguilles prenant rapidement la forme de branches.
Morphine chlorhydrate :	Formation immédiate d'étoiles et de touffes en aiguilles.
Narcéine :	Touffes en forme de branches.
Pilocarpine chlorhydrate :	Formation d'aiguilles ramifiées.
Strychnine chlorhydrate :	Touffes d'aiguilles droites ou ramifiées.
Pipérine : (dissoute dans HCl)	Touffes d'aiguilles jaunes partiellement recourbées.
Stovaïne :	Formation rapide d'aiguilles et plumes partiellement recourbées et en touffes.
Novocaïne chlorhydrate :	Formation progressive de touffes et rosettes de cristaux foliacés.
Tutocaïne :	Formation lente de touffes et d'étoiles en petites aiguilles.
Alypine chlorhydrate :	Aiguilles isolées ou groupées en agrégats variés.

Cocaïne chlorhydrate :	Formation lente d'étoiles et touffes de fines aiguilles. Ne se produisent qu'après un certain temps et pas régulièrement.
Tropacocaïne chlorhydrate :	Formation de petites glandes en étoiles en fines aiguilles.

Nous avons vérifié au microscope les différentes formes de cristallisation dont ROSENTHALER [3] a laissé les dessins; seule la novocaïne nous a donné une cristallisation très différente; or ce produit obtenu par synthèse donne peut-être des reineckates de formes différentes suivant la préparation ou suivant les concentrations.

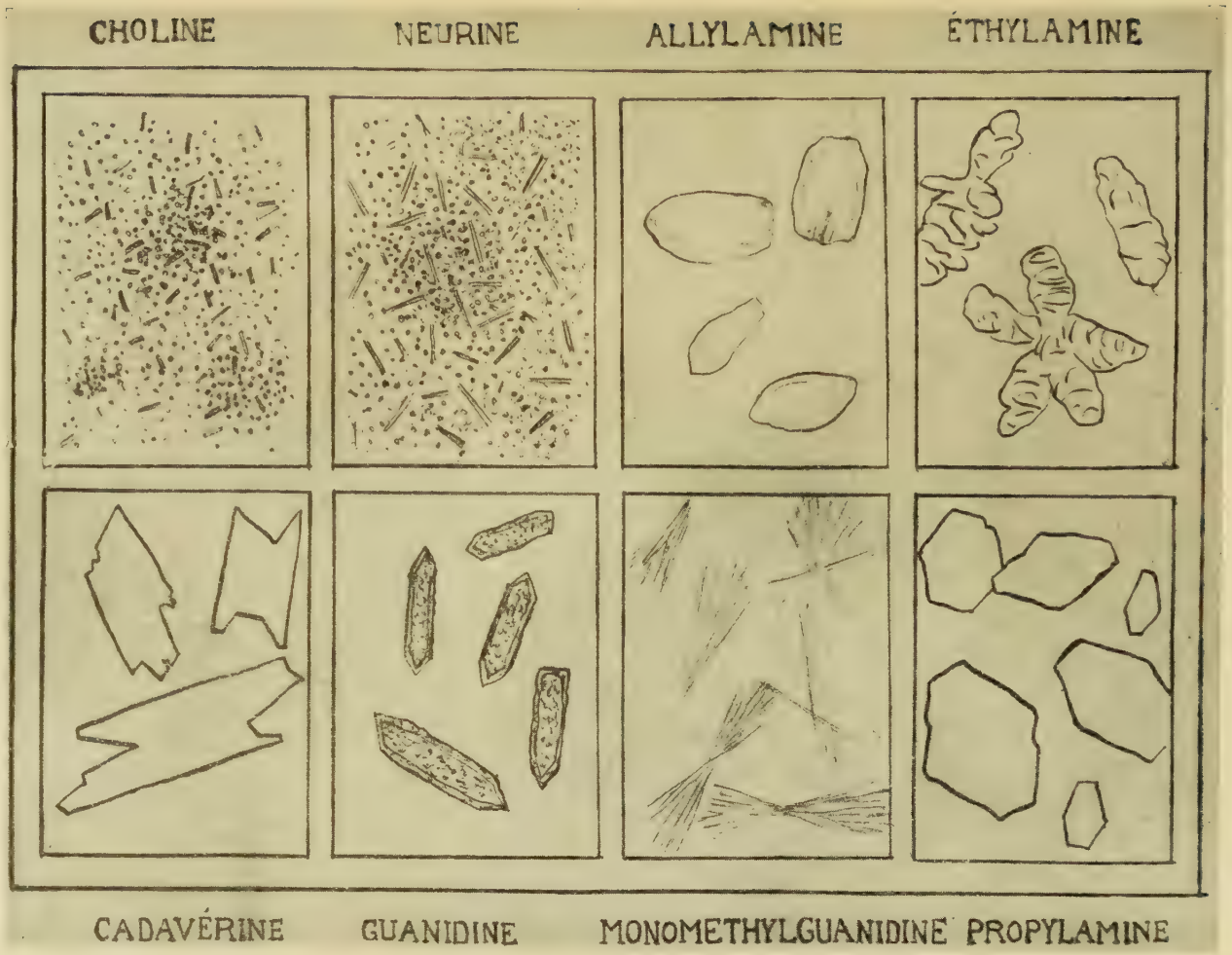
CHAPITRE II

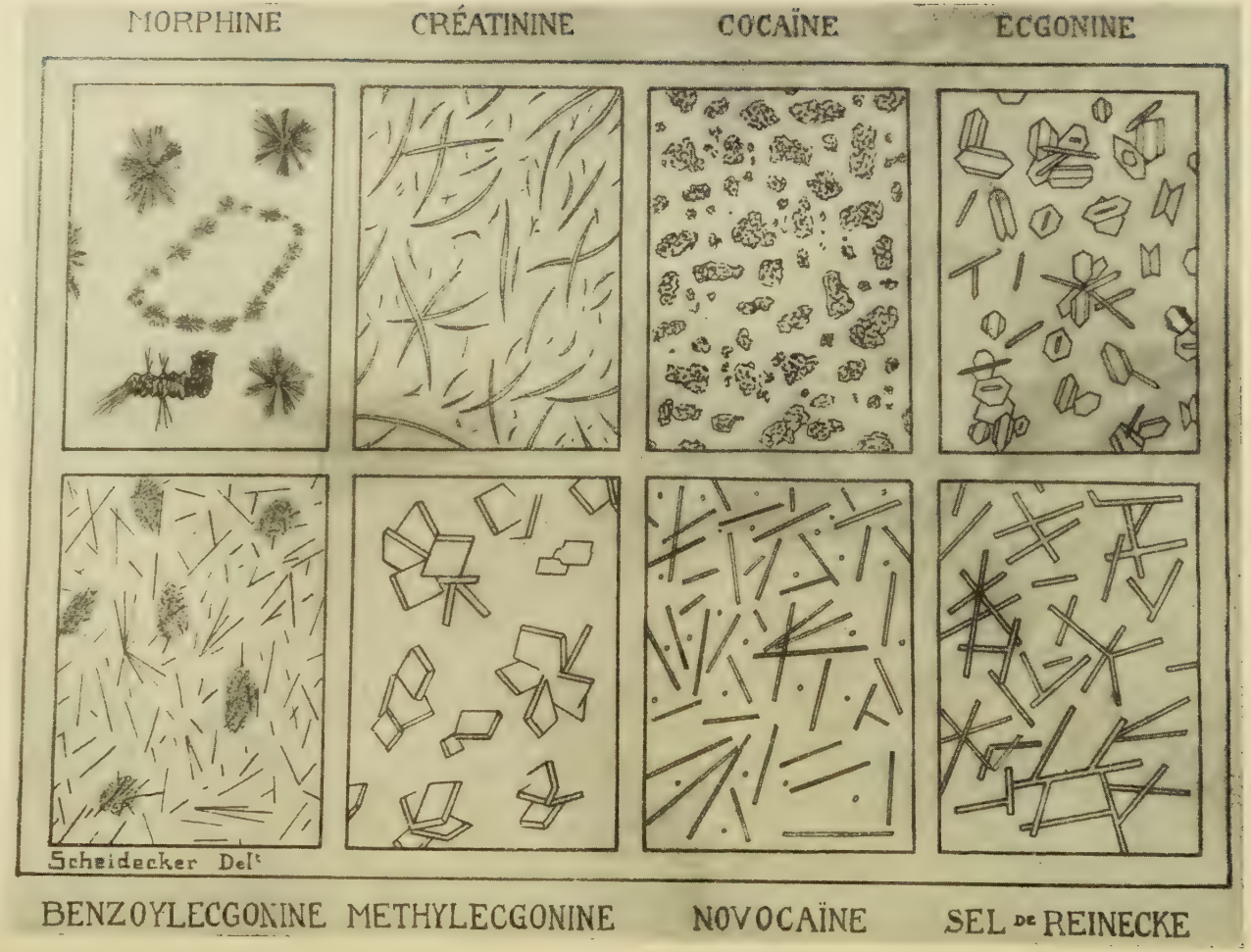
ETUDE MICROCRISTALLINE DE QUELQUES BASES ORGANIQUES AZOTÉES

Nous avons continué cette intéressante étude microscopique sur une série d'autres alcaloïdes et amines. Les alcaloïdes du quinquina présentent une différence marquante entre la quinine, qui est formée de petites aiguilles groupées en étoiles, et la cinchonine et la cinchonidine qui forment des cristaux groupés en fleurs; mais ces deux derniers, à cause de leur grande ressemblance, ne peuvent être différenciés. La cocaïne et ses dérivées d'hydrolyse : méthylecgonine, benzoylecgonine et ecgonine ont une cristallisation bien plus caractéristique, nettement différente, et facilement reconnaissable à un simple examen à l'objectif 3. La cocaïne se présente sous forme d'un précipité pulvérulent; la benzoylecgonine en longues aiguilles fines assemblées en branches de genêt; la méthylecgonine forme des mâcles groupées en œillets; l'ecgonine des cristaux très réguliers à bords droits et terminés souvent en queue d'hirondelle.

Nous avons eu ensuite la curiosité d'étudier la cristallisation

de quelques reineckates d'amines. Là encore nous avons obtenu des aspects microscristallins très variés. Tandis que la choline et la neurine présentent de très fines aiguilles groupées par deux au milieu d'un pointillé, la bétaïne donne des fers de lance, la cadavérine forme de très grandes plaques irrégulières. La guanidine cristallise en feuilles allongées striées en tous sens, alors que la monométhylguanidine forme de longues aiguilles effilées aux deux extrémités. L'allylamine a de très gros cristaux allongés, et l'éthylamine des cristaux encore plus gros, isolés ou groupés en étoiles, à bords ondulés et striés verticalement. La triéthanolamine fournit enfin, avec le réactif de REINECKE, des tables hexagonales.


CHOLINE
NEURINE
ALLYLAMINE
ÉTHYLAMINE
CADAVÉRINE
GUANIDINE
MONOMETHYLGUANIDINE
PROPYLAMINE


MORPHINE
CRÉATININE
COCAÏNE
ECGONINE
Scheidecker Del.
BENZOYLECGONINE
METHYLECGONINE
NOVOCAÏNE
SEL DE REINECKE

Chapitre III

APPLICATION DES PROPRIÉTÉS MICROCRISTALLINES DE CERTAINS REINECKATES

Cette heureuse propriété d'un grand nombre de reineckates à donner une cristallisation caractéristique, nous a permis de faire toute une série d'applications :

a) — *Amines cadavériques :* Il nous a été possible de recueillir, au cours d'une expertise toxicologique, des amines obtenus à la fin de la distillation dans la recherche des poisons volatils. Il s'agissait d'une femme qui avait été inhumée du 17 février au 15 mai environ: les viscères ont été conservés à la glacière jusqu'au 15 juin, date à laquelle a eu lieu la distillation. Le distillat, acidifié avec de l'acide chlorhydrique, nous a donné un léger précipité qui, observé au microscope, a montré la cristallisation caractéristique de la choline et de la neurine, avec de temps à autre un gros cristal de cadavérine.

b) — *Ptomaïnes volatiles :* Nous avons également tenté de caractériser les ptomaïnes volatiles dans des atmosphères confinées, en les condensant en même temps que de la vapeur d'eau. Mais la précipitation des reineckates d'amines étant dans ces conditions beaucoup moins sensibles que la réduction du permanganate de potassium, nous n'avons pas jugé utile de poursuivre ces essais qui, d'ailleurs, n'ont pas permis de reconnaître la nature de ces amines.

c) — *Caractérisation des alcaloïdes dans un mélange :*

A cet effet nous avons choisi le pantopon, qui représente les alcaloïdes totaux de l'opium. Précipité en solution aqueuse par le sel de Reinecke, nous n'avons obtenu primitivement qu'un précipité grenu. Nous avons ensuite dissout le pantopon à chaud, dans le but d'éliminer le tannin, qui peut empêcher la cristallisation, et de précipiter après refroidissement. Nous avons alors observé au microscope les mâcles caractéristiques de la morphine, au milieu d'un précipité pulvérulent; les autres reineckates (de narcotine, de papavérine etc...) sont en effet amorphes.

d) — *Caractérisation de la strychnine et de la brucine dans un mélange :*

Nous sommes parvenue à caractériser une partie de brucine à côté de 500 de strychnine; comparons la sensibilité de quelques-unes des réactions colorées courantes. A la teneur de 2 % de brucine dans la strychnine, on n'obtient plus de coloration rose avec SO^4H^2 concentré à froid. C'est la limite de sensibilité de la réaction à l'acide nitrique additionné de trois fois son poids d'eau : avec cette réaction indiquée par le Codex [23] on n'obtient plus de coloration rouge, mais une faible coloration jaune orangée. Seul NO^3H concentré donne encore une réaction positive : coloration rouge sang. A la teneur de 1 p. 500 on ne perçoit plus cette teinte, mais une faible coloration jaune.

On décèle avec facilité une partie de strychnine à côté de 10.000 parties de brucine, en examinant les reineckates qui sont très dissemblables : celui de strychnine est de taille plus grande et dessine des branches qui se distinguent du reineckate de brucine grenu. Donc le problème de la recherche de la strychnine dans la brucine est beaucoup plus aisé que le problème inverse, à cause de la grandeur des aiguilles de reineckate de strychnine, qui se présentent en rameaux au milieu du précipité très tenu que donne la brucine. Une telle sensibilité est impossible avec les réactions colorées. Ainsi nous avons remarqué que les réactions usuelles ne permettent pas de retrouver 1 partie de strychnine dans 50 de brucines. A 1 p. 35 le réactif de Mandelin produit une coloration saumon, puis après quelques instants on voit apparaître des stries violacées (limite de sensibilité). La réaction d'Otto au mélange sulfochromique, est négative avec ce mélange.

e) — *Séparation quantitative de la brucine et de la strychnine :*

On sait qu'il a été jusqu'à présent impossible, à l'aide des réactifs précipitants, de séparer quantitativement les deux alcaloïdes de la noix vomique : la strychnine et la brucine. Nous nous sommes donc proposée de résoudre ce problème en tâchant de séparer les deux alcaloïdes à l'état de reineckates. Nous basant sur les caractères de solubilité variant d'un reineckate à l'autre, notre but était de trouver un dissolvant de l'un et pas de l'autre.

C'est le cas de l'acétate d'éthyle, qui dissout le reineckate de brucine et laisse insoluble celui de strychnine. Nous nous sommes d'abord assurée de cette précieuse propriété au moyen d'essais témoins, en agitant énergiquement et séparément 1 gr. de reineckate de brucine dans 50 cc d'acétate d'éthyle, et 1 gr. de reineckate de strychnine dans la même quantité de liquide. Tandis que le premier se dissolvait totalement, le second restait pratiquement insoluble. Ce dernier, filtré, séché et pesé dans les conditions habituelles, nous a donné la quantité de reineckate de strychnine employée au départ. Après calcination en sesquioxyde de chrome pour la contre épreuve, nous avons obtenu un résultat théorique, ce qui prouve qu'il n'y a eu aucune perte par solubilité.

Nous avons fait ensuite dans une éprouvette un mélange de 0,02 de brucine et de 0,02 de strychnine, que nous avons dissout et précipité par le sel de Reinecke: après quelques heures d'attente à la glacière, nous avons ajouté 2 à 3 cc d'acétate d'éthyle et secoué énergiquement l'éprouvette pendant quelques secondes. Nous avons ensuite examiné au microscope le dépôt solide rassemblé sur le filtre, pour ne trouver que la cristallisation caractéristique du reineckate de strychnine.

D'autre part nous avons évaporé à la température ordinaire l'acétate d'éthyle contenant en dissolution le reineckate de brucine. Après 24 heures environ, il est resté au fond de l'éprouvette un dépôt blanc qui, repris par l'eau acidulée et précipité par le sel de Reinecke, a montré au microscope le précipité pulvérulent caractéristique du reineckate de brucine.

De nombreuses expériences pratiquées avec l'acétate d'éthyle nous ont donné la certitude qu'on pouvait totalement dissoudre 1 gr. de reineckate de brucine dans 50 cc d'acétate d'éthyle, tandis que le reineckate de strychnine restait, dans les mêmes proportions, absolument insoluble. Mais avec une quantité supérieure de dissolvant, le reineckate de strychnine commence également à se dissoudre partiellement. Avec 5 fois plus d'acétate d'éthyle, nous perdons 1/3 de reineckate de strychnine.

Néanmoins, ayant exactement défini la limite d'insolubilité du reineckate de strychnine, il nous a été possible de proposer un

procédé de dosage exact de la strychnine dans le mélange de strychnine et de brucine. Voici notre manière d'opérer :

On dissout au bain-marie le mélange de brucine et de strychnine qu'on a mis en présence d'eau acidulée légèrement par l'acide nitrique. Après refroidissement à la glacière on précipite par un excès de sel de Reinecke et on laisse reposer pendant quelques heures à la glacière afin d'obtenir le précipité complet. On filtre, on lave à l'eau seulement, on sèche et pèse, on traite le précipité sur le filtre avec de l'acétate d'éthyle, en respectant les proportions indiquées plus haut, pour dissoudre le reineckate de brucine; on sèche et repèse. Le poids final doit donner la quantité de strychnine contenue dans le mélange.

f) — *Hydrolyse de la cocaïne :*

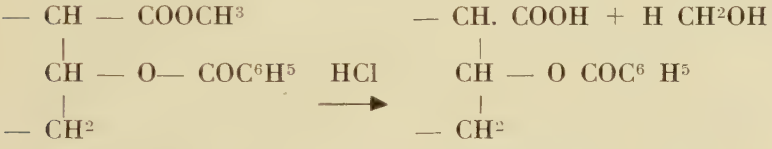
Une étude particulière de la cocaïne et de ses dérivés d'hydrolyse offrait un intérêt toxicologique. On sait avec quelle facilité la cocaïne se dédouble en donnant naissance à la benzoylecgonine et en milieu alcalin (pH = 11) à l'ecgonine. Elle peut également en milieu très acide (pH = 1) ou très alcalin (PH = 13) donner la méthylecgonine, elle-même peu stable et rapidement diméthylée en ecgonine. Or, la cocaïne et les produits qui en dérivent ont des reineckates très différents et facilement reconnaissables au microscope.

Pour rechercher l'hydrolyse de la cocaïne *in vitro* nous avons procédé de la manière suivante : Dans des béchers nous avons préparé des solutions de cocaïne, l'une alcaline, l'autre acide, dans les proportions de 0,1 de chlorhydrate de cocaïne + 10 cm^3 d'eau distillée + 1 cc de NaOH N, en remplaçant dans la deuxième solution 1 cm^3 de NaOH par 1 cm^3 de H Cl pur. Ces béchers recouverts d'un verre à montre, pour empêcher l'évaporation et par conséquent un changement de concentration et de pH, ont été portés au bain-marie et chauffés. Nous avons fait des prélèvements de 5 minutes en 5 minutes de une goutte de solution: ces gouttes, prélevées sur lame, refroidies et acidifiées, ont été précipitées par le sel de Reinecke. Les précipités, observés au microscope, ont révélé les phases de décomposition de la cocaïne, qui se traduisent comme suit :

Dans la solution acide, à 30°, apparition de longues aiguilles

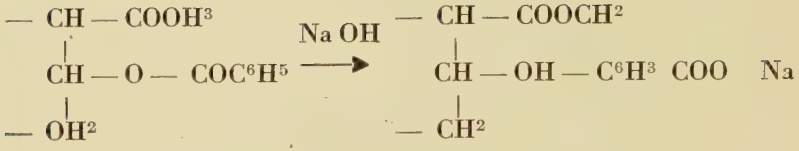
fines de benzoylecgonine, isolés ou groupés en branches de genêt, au milieu d'un précipité pulvérulent de cocaïne non transformée. En continuant l'hydrolyse, les cristaux de benzoylecgonine augmentent, mais à l'ébullition ils diminuent pour faire place à une formation d'aiguilles groupées en houppes. Après huit heures de chauffe au bain-marie, les cristaux de benzoylecgonine deviennent extrêmement rares tandis qu'augmente la cristallisation en houppes, que nous n'avons pas caractérisée. On peut ensuite prolonger la cuisson sans arriver à une autre cristallisation.

Il est logique qu'en milieu acide nous obtenions de la benzoylecgonine. Comme l'indique la formule de constitution, c'est le radical alcoolique H CH^2 OH qui est le premier détaché de la cocaïne par l'acide :



cocaïne — benzoylecgonine

En milieu alcalin la solution chauffée au bain-marie donne à partir de l'ébullition de beaux cristaux d'ecgonine, mais, jusqu'à cette température, il nous a été impossible de définir le précipité, qui restait grenu. Nous avons alors essayé de chauffer la solution à feu nu. Entre la température de 40° et de 80° nous avons observé la formation de rares cristaux mâclés et assemblés en œillets, caractéristique de la méthylecgonine. Cette dernière, très instable, se transforme rapidement, à 80°, en ecgonine qui se présente d'abord et fugitivement en aiguilles groupées en fuseaux, ensuite en cristaux larges à bords terminés en queues d'hirondelles, forme la plus stable de l'ecgonine. En effet, il nous a été possible de chauffer la solution 10 heures et plus, le reineckate se raréfie de plus en plus et ne précipite qu'avec une solution très récente de sel de Reinecke, mais on n'observe au microscope que quelques beaux et rares cristaux d'ecgonine. A aucune température nous n'avons observé la formation de benzoylecgonine. Ceci se conçoit au point de vue chimique ,car en milieu alcalin la saponification doit enlever uniquement le radical acide, soit l'acide benzoïque :



cocaïne méthylecgonine

L'hydrolyse de la cocaïne ayant été facile à réaliser *in vitro*, nous avons essayé l'expérience *in vivo*. A cet effet nous avons mis dans un vase clos 0,10 gr. de chlorhydrate de cocaïne, 10 cc d'eau et quelques grammes de foie de lapin, récemment prélevé et haché. Nous avons laissé ce mélange en contact pendant 24 heures à l'étuve réglée à 37°, pour effectuer l'hydrolyse biologique de la cocaïne. Nous avons procédé ensuite à l'extraction de la cocaïne et de ses dérivés par la méthode de Stas-Otto. Nous avons placé dans un ballon, muni d'un réfrigérant ascendant, le foie additionné de cocaïne, avec 100cc d'alcool à 95° fortement acidulé par l'acide tartrique. Nous avons chauffé ce mélange au bain-marie pendant une demi-heure, puis refroidi, exprimé et filtré. La solution a été recueillie dans une capsule, évaporée au bain-marie à consistance sirupeuse, reprise par de l'eau distillée et filtrée. Après avoir une première fois épuisé la solution aqueuse acide par 30 cc d'éther, nous l'avons alcalinisée par CO^3Na^2 et épuisé à nouveau et plusieurs fois par 30 cc d'éther. Les alcaloïdes-bases, mis en liberté et dissous par l'éther, sont évaporés au bain-marie sur un verre de montre, repris par quelques gouttes d'eau acidulée et précipités par le réactif de Reinecke. Nous n'avons retrouvé au microscope qu'une cristallisation pulvérulente mélangée de houppes caractéristiques de la cocaïne. La solution aqueuse acide précipite également et très abondamment par le réactif de Reinecke, donnant naissance à la même cristallisation observée précédemment. Nous n'avons trouvé aucune trace de benzoylecgonine, de méthylecgonine ou d'ecgonine.

Cette expérience ne suffit évidemment pas à elle seule pour déduire que la cocaïne ne se dédouble pas *in vivo*. Cependant il apparaît que l'hydrolyse, si elle a lieu, ne se produit pas aussi aisément que par les agents chimiques que nous avions employés *in vitro*.

Conclusions

Nous avons précisé, grâce à de nombreuses expériences, les conditions de précipitation des substances organiques, et pour faciliter les travaux futurs nous avons classé celles-ci en trois groupes suivant qu'elles précipitent entièrement, partiellement ou ne précipitent pas du tout.

Nous avons mis au point la technique de précipitation des bases organiques azotées, en observant l'influence des sels neutres, en définissant le pH optimum de précipitation. Nous avons indiqué les précautions à prendre pour la filtration des précipités (verre poreux), les erreurs à éviter par solubilité des reineckates dans l'eau, l'alcool etc... et la manière la plus correcte d'effectuer la dessiccation des précipités.

Un certain nombre de reineckates ont été préparés pour la première fois au cours de ce travail (quinidine, cinchonine, cinchonidine, ecgonine, benzoylecgonine, méthylecgonine, etc...). Nous avons déterminé, pour beaucoup d'entre eux, la solubilité dans l'eau et les solvants organiques.

Nous avons essayé d'attirer l'attention sur le dosage gravimétrique; si certaines substances organiques azotées ne nous ont pas donné un résultat théorique, d'autres par contre réputées incomplètement précipitables par l'acide silicotungstique et les réactifs généraux, nous ont donné un résultat quantitatif. Nous avons indiqué la liste des alcaloïdes et bases aminées qui précipitent complètement par le Sel de Reinecke ; nous recommandons d'employer ce réactif toutes les fois que cela est indiqué, comme étant un moyen relativement rapide et sûr ; dans quelques cas particuliers l'intermédiaire des reineckates, dont la sélectivité est augmentée grâce à des solvants de choix, nous a permis de résoudre certains problèmes analytiques qui n'avaient pas reçu de solution.

Au cours de nos expériences nous avons eu l'occasion de déterminer la constitution de divers reineckates, qui varie avec la basicité du corps chimique employé; une molécule d'alcaloïde peut s'unir à une ou à deux molécules de Sel de Reinecke, alors que jusqu'à présent on admettait une molécule de réactif pour une molécule d'alcaloïde.

Une expérience intéressante a été mise au point, permettant de doser avec rapidité de très petites quatités d'alcaloïdes par semi-microdosage, méthode très précieuse en toxicologie. Nous avons réussi également à séparer quatitativement la strychnine et la brucine; la recherche de pureté de ces alcaloïdes est facile à contrôler au microscope.

La propriété des reineckates de donner des formes de cristallisation variées, ont permis de faire d'intéressantes expériences micrographiques.

En particulier il semble possible de rechercher, dans un mélange d'alcaloïdes naturels, l'un des constituants (morphine dans les préparations à base d'opium). Certaines études, comme le dédoublement de la cocaïne sous l'influence de divers agents chimiques ou biochimiques, peuvent être abordées grâce à ce réactif d'avenir.

Tant dans la recherche qualitative que dans l'analyse quantitative, le Sel de Reinecke doit avoir sa place à côté des autres réactifs généraux de précipitation.

Bibliographie

N. B. — *La numérotation suit l'ordre d'apparition dans le texte. Les auteurs cités plusieurs fois conservent le numéro primitif.*

(16) G. Bertrand, Bull. Soc. Chim., 1899, *31*, 434.

(18) Chatelet, Comptes rendus Ac. Sc., 1933, *196*, 1607 — p. 987.

(23) Codex Médicamentarius Gallicus, 6e édit., t. 2, p. *987*, *Oberthür, Rennes 1937.*

(2) O. T. Christensen, Journ. prakt. Chem. 1892, *45*, 356.

(12) H. D. Dakin, Journ. biol. Chim. 1933, *99*, 531.

(21) P. Duquénois et Mlle Faller, Bull. Soc. Chim., 5e série, 1939, *t. 6*, 786 et 998.

(22) P. Duquénois, Ann. Méd. Lég. 1939, *19*, 438.

(20) W. J. Furst, Contribution à l'étude physico-chimique et pharmacologique du Fénugrec et de ses principaux constituants. Thèse doc. Univ. (Pharm.), Strasbourg 1939.

(17) Gonnard, Bull. Soc. Chim. biolog., 1939, *21*, 12.

(7) Hantzsch (A.) et Carlsohn (H.), Ztschr. f. anorganische Chem., 1926, *156*, 199-209.

(8) Hein (Fr.) et Segitz (Fr. A.), Ztschr. f. anorganische Chem., 1926, *158*, 153-174.

(19) J. Julien, Contribution à l'étude du pouvoir rotatoire de quelques alcaloïdes en fonction du pH, Thèse Doct. Univ. (Pharm.), Strasbourg, 1936, p. 74 et 86.

(5) Kahane E. J., J. Pharm. Chim. 1935, *22*, 254.

(15) E. Kahane et Coupechoux, Bull. Soc. Chim. 1936, *3*, 1588.

(4) Kapfhammer (J.) et Bischoff (C.), Ztschr. f. physiol Chem. 1930, *191*, 179-182.

(13) Kapfhammer (J.) et Spörer (N.), Ztschr. f. physiol. Chem., *173*, 245-249.

(13) Kapfhammer (J.) et Spörer (H.), Ztschr. f. physiol. Chem., *173*, 245-249.

(10) Kapfhammer (J.) et Eck (R.), Ztschr. f. physiol. Chem. 1927, *170*, 294-312.

(11) Mamoli, Ciocca et Dansi, Ann. Chim. Applic. 1932, *22*, 561-566.

(6) Nordenskjöld (O.), Ztschr. Anorg. Chem. 1892, *1*, 126-143.

(1) Reinecke (O.), Ann. Chem., 1863, *126*, 113-118.

(3) Rosenthaler (L.), Arch. Pharm. 1927, *265*, 319.

(14) Smorodintzew (J. A.), Ztschr. f. physiol. Chem. 1930, *189*, 710.

(9) Terada (M.), Ztschr. f. physiol. Chem. 1927, *170*, 289-295.

Table des matières

Page

Avant-Propos 9

PREMIÈRE PARTIE

PRÉCIPITATION DES SUBSTANCES ORGANIQUES A FONCTIONS DIVERSES

Chap. 1. — Action précipitante du Sel de REINECKE..... 12

Chap. 2. — Conditions de précipitation des Reineckates.... 20

DEUXIÈME PARTIE

DOSAGE DES BASES ORGANIQUES AZOTÉES PAR LE SEL DE REINECKE

Chap. 1. — Dosage Gravimétrique 31

Chap. 2. — *Dosage Colorimétrique* 41

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHE MICROCRISTALLINE DES BASES ORGANIQUES AZOTÉES

Chap. 1. — Méthodes de ROSENTHALER pour les recherches microcristallines 46

Chap. 2. — Etude microcristalline de quelques Bases organiques azotées 51

Chap. 3. — Application des propriétés microcristallines de certains Reineckates 55

Conclusions 61

Bibliographie 63